

Einfluss von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB auf die Expression, Proteinkonzentration und proteolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 in kurz-passagierten synovialen Fibroblasten von Patienten mit Gelenktrauma und rheumatoider Arthritis

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR MEDICINAE (DR. MED.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jan-Helge Klingler
geboren am 18. Dezember 1978 in Rothenburg ob der Tauber

19. Januar 2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. W. Kinne
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Wiederanders
Dritter Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. November 2006

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACR	engl. <i>American College of Rheumatology</i>
ADAM	engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AP	engl. <i>activator protein</i>
APC	aktiviertes Protein C
APMA	engl. <i>p-aminophenylmercuric acetate</i>
ARA	engl. <i>American Rheumatism Association</i>
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CRP	C-reaktives Protein
Cys	Cystein
DMEM	engl. <i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreithol
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
egr	engl. <i>early growth response factor</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EPA	engl. <i>erythroid potentiating activity</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>
FGFR	engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GT	Gelenktrauma
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
His	Histidin
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton

LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MDB	engl. <i>membrane desalting buffer</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MIP	engl. <i>macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPI	Matrixmetalloproteinasen-Inhibitor
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MT	Mikrotiter
MT-MMP	Membran-Typ Matrixmetalloproteinase
MTX	Methotrexat
MW	Molekulargewicht
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	engl. <i>nonsteroidal antiinflammatory drug</i>
OA	Osteoarthritis
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PEA	engl. <i>polyoma enhancer A binding protein</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMA	engl. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SF	Synovialflüssigkeit
SFB	synoviale Fibroblasten
SM	Synovialmembran
SP	engl. <i>specificity protein</i>
TBS-T	engl. <i>tris-buffered saline-tween</i>
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
TIMP	engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	9
2.	EINLEITUNG	11
2.1	Die rheumatoide Arthritis (RA)	11
2.1.1	Veränderungen am Gelenk und an der Synovialmembran in der RA	12
2.1.2	Synoviale Zellen in der RA	14
2.1.2.1	Synoviale Makrophagen in der RA	14
2.1.2.2	Synoviale Fibroblasten (SFB) in der RA	15
2.2	IL-1 β , TNF- α und PDGF in der RA	17
2.2.1	Bedeutung von IL-1 β in der RA	17
2.2.2	Bedeutung von TNF- α in der RA	18
2.2.3	Bedeutung von PDGF in der RA	19
2.3	Matrixmetalloproteinasen (MMP).....	21
2.3.1	Bedeutung der MMP bei physiologischen und pathologischen Prozessen.....	21
2.3.2	Untergliederung und Struktur der MMP.....	22
2.3.3	MMP in der RA	29
2.3.4	MMP-2 (Gelatinase A).....	30
2.3.4.1	Bedeutung der MMP-2	31
2.3.4.2	Regulierung und Aktivierung der proMMP-2	33
2.3.4.3	Detektionsmöglichkeiten der MMP-2	37
2.4	Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP).....	38
2.4.1	Bedeutung der TIMP	38
2.4.2	Struktur und Funktion der TIMP	39
2.4.3	Mitglieder der TIMP-Familie	40
2.4.4	TIMP in der RA	41
3.	ZIELE DER ARBEIT	42
4.	METHODIK	45
4.1	Patienten	45
4.2	In vitro Kultur von SFB aus GT- und RA-Patienten.....	46
4.2.1	Isolierung von Zellen aus der Synovialmembran	46
4.2.2	Reinigung der synovialen Zellen mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads	46
4.2.3	Stimulierung der GT- und RA-SFB mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB	47
4.3	Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie	47
4.3.1	Detektion von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie.....	47
4.3.2	Analyse und Auswertung.....	49
4.4	Bestimmung der MMP-2-Expression in stimulierten GT- und RA-SFB.....	49
4.4.1	Isolierung der RNA aus GT- und RA-SFB.....	49
4.4.2	cDNA-Synthese	50
4.4.3	Realtime-PCR.....	50
4.4.3.1	Realtime-PCR-Bedingungen	51
4.4.3.2	Auswertung.....	51
4.5	Bestimmung des MMP-2-Proteins in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB	52
4.5.1	Spezifische MMP-2-Detektion mittels Western-Blots	52
4.5.2	Bestimmung der proMMP-2-Konzentration mittels ELISA	54
4.6	Bestimmungen der MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB	55

4.6.1	Bestimmung der Aktivität der prozessierten MMP-2 sowie der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels spezifischer Aktivitäts-Assays.....	55
4.6.2	Bestimmung der Aktivität der prozessierten MMP-2 sowie der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels Zymographie.....	56
4.6.3	Bestimmung der Total-MMP-Aktivität mittels unspezifischer Aktivitäts-Assays.....	57
4.7	Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie.....	58
4.8	Statistische Analyse.....	59
5.	ERGEBNISSE	60
5.1	Charakterisierung der Patienten	60
5.2	Charakterisierung der mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads negativ gereinigten SFB von GT- und RA-Patienten	61
5.3	Bestimmung der MMP-2-mRNA-Expression in stimulierten GT- und RA-SFB mittels Realtime-PCR.....	62
5.4	Bestimmung des MMP-2-Proteins in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB	64
5.4.1	Spezifische MMP-2-Detektion mittels Western-Blot.....	64
5.4.2	Bestimmung der proMMP-2-Konzentration mittels ELISA	64
5.5	Bestimmungen der MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB	66
5.5.1	Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität.....	66
5.5.1.1	Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels spezifischer Aktivitäts-Assays mit APMA.....	66
5.5.1.2	Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels Zymographie	68
5.5.2	Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2	70
5.5.2.1	Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2 mittels spezifischer Aktivitäts-Assays ohne APMA	70
5.5.2.2	Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2 mittels Zymographie	72
5.5.3	Bestimmung der Total-MMP-Aktivität	74
5.6	Absolutwerte der Protein- und Aktivitätsbestimmungen	76
5.7	Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie	76
5.8	Korrelationsanalysen	77
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	80
6.	DISKUSSION	83
6.1	Reinheit der verwendeten SFB.....	83
6.2	Vergleichende Analysen von MMP-2 in GT-SFB und RA-SFB bzw. deren Überständen nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB.....	84
6.2.1	MMP-2-mRNA-Expression in stimulierten GT-SFB und RA-SFB.....	85
6.2.2	ProMMP-2-Konzentration in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB	87
6.2.3	MMP-2-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB	89
6.2.3.1	Gesamt-MMP-2-Aktivität.....	91
6.2.3.2	Aktivität der prozessierten MMP-2	92
6.2.4	Total-MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB.....	98
6.3	Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie	99
6.4	Vergleichende Analyse des spezifischen Aktivitäts-Assays und der Zymographie zur Ermittlung der MMP-2-Aktivität in den Überständen von SFB	100
6.5	Bedeutung der Korrelationen zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Parametern der Patienten.....	102
7.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	104

8.	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	107
9.	ANHANG	125
9.1	Abbildungsverzeichnis	125
9.2	Tabellenverzeichnis	126
9.3	Danksagung	127
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	128
9.5	Lebenslauf	129
9.6	Publikationen.....	130
9.6.1	Abstracts	130
9.6.2	Originalpublikationen.....	130

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) zählt zu den entzündlichen rheumatischen Erkrankungen. Die Entzündung und die fortschreitende Destruktion von diarthroiden Gelenken stellen klassische Merkmale im Verlauf der Erkrankung dar. Dieser Destruktionsprozess wird auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen matrixdegradierenden Enzymen, den Matrixmetalloproteinasen (MMP), und deren spezifischen Inhibitoren, den TIMP, zugunsten der MMP zurückgeführt. Aktivierte synoviale Fibroblasten (SFB) tragen durch eine erhöhte Synthese von MMP maßgeblich zu diesem Destruktionsprozess bei.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von IL-1 β , TNF- α sowie PDGF-BB auf die Genexpression, Proteinkonzentration und proteolytische Aktivität der MMP-2 bei kurzpassagierten GT (Gelenktrauma)-SFB und RA-SFB.

Methodik: Isolierte GT-SFB (3. Passage) und RA-SFB (2. Passage) wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β (10, 50, 100 U/ml), TNF- α (1, 10, 25 ng/ml) oder PDGF-BB (2.5, 5, 10 U/ml) stimuliert. Die MMP-2-mRNA-Expression wurde mittels Realtime-PCR ermittelt, die proMMP-2-Konzentration mittels ELISA. Die proteolytische Aktivität der MMP-2 wurde in der Gelatine-Zymographie und in einem kommerziellen, spezifischen Aktivitäts-Assay bestimmt. Weiterhin erfolgte in einem unspezifischen Aktivitäts-Assay die Analyse der Total-MMP-Aktivität und in der Reversen Zymographie die Analyse der TIMP. Die statistische Analyse der Zytokineinflüsse wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test in exakter zweiseitiger Signifikanzbestimmung ($P \leq 0.05$) durchgeführt; für die Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit zweiseitiger Signifikanz verwendet ($P \leq 0.05$).

Ergebnisse: Die eingesetzten Stimulierungen mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die MMP-2-mRNA-Expression, proMMP-2-Konzentration und Gesamt-MMP-2-Aktivität (Aktivität der proMMP-2 und prozessierten MMP-2) bei GT- und RA-SFB. Die Aktivität der freien prozessierten MMP-2 wurde bei GT-SFB durch IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB signifikant vermindert, bei RA-SFB allerdings nur durch PDGF-BB. Die Total-MMP-Aktivität wurde bei GT-SFB durch IL-1 β und PDGF-BB signifikant vermindert, bei RA-SFB hingegen lediglich durch PDGF-BB. Nach Stimulierung der RA-SFB mit TNF- α lagen positive Korrelationen zwischen der proMMP-2-Konzentration und der Erkrankungsdauer sowie zwischen der absoluten Total-MMP-Aktivität und dem CRP-Spiegel vor.

Diskussion/Schlussfolgerungen: Diese Arbeit bekräftigt die These der posttranslationalen, lokalen Regulation der MMP-2, weil die MMP-2-mRNA-Expression, proMMP-2-Konzentration sowie Gesamt-MMP-2-Aktivität von den Zytokinstimulationen unbeeinflusst blieben. Überdies wurde unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen die Aktivität der freien prozessierten MMP-2 in GT-SFB durch IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB vermindert, wohingegen sie in RA-SFB lediglich durch PDGF-BB vermindert wurde. Folglich kann in RA-SFB eine verminderte Ansprechbarkeit auf gewebsschützende Signale durch IL-1 β und TNF- α angenommen werden, wodurch die pathologisch *unverminderte* MMP-2-Aktivität die Knorpel- und Knochendestruktion in entzündeten Gelenken unterhält. Dies wird auch durch die positive Korrelation zwischen der TNF- α -induzierten proMMP-2-Konzentration und der Erkrankungsdauer unterstützt, die auf einen Zusammenhang mit dem Stadium bzw. dem Schweregrad der Krankheit hindeutet. Somit ergeben sich möglicherweise Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien in der RA. Allerdings müssen die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zunächst in weiterführenden Arbeiten geklärt werden, um anschließend zielgerichtete therapeutische Ansätze zur Behebung der Defekte in RA-SFB zu entwickeln.

Mit dieser Arbeit wird für PDGF-BB erstmals eine mögliche gewebsschützende Funktion in SFB gezeigt. Nach Stimulation mit PDGF-BB wurde bei GT- und RA-SFB die Aktivität der freien und somit proteolytisch aktiven, prozessierten MMP-2 sowie die Total-MMP-Aktivität vermindert. Folglich ist die physiologische Ansprechbarkeit der RA-SFB auf PDGF-BB intakt. Auch dieses neue Erkenntnis könnte zu neuen Behandlungsansätzen führen. Jedoch müssen zunächst weitere Untersuchungen folgen, um die kausale PDGF-Isoform bzw. PDGF-Rezeptorkette zu identifizieren. Als nächster Schritt wären *in vivo* Versuche z. B. mit einem entsprechenden PDGF-Analogen mit dem Ziel denkbar, die fortschreitende Knorpel- und Knochendestruktion in arthritischen Gelenken zu verhindern.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über den Einfluss der Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie des Wachstumsfaktors PDGF-BB auf isolierte GT-SFB und RA-SFB. Besonders aus der Resistenz der RA-SFB gegenüber der gewebsschützenden Wirkung von IL-1 β und TNF- α sowie aus der gewebsschützenden Wirkung von PDGF-BB auf GT-SFB und RA-SFB ergeben sich vollkommen neue Sichtweisen bezüglich der Rolle dieser Zytokine in der RA.

2. EINLEITUNG

2.1 Die rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung. Sie ist mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 1% der häufigste Vertreter der entzündlichen Arthritiden und verursacht erhebliche volkswirtschaftliche Kosten. So betrugen im Jahr 2001 die jährlichen direkten Kosten pro Patient in Deutschland durchschnittlich ca. 3 800 €, durch Arbeitsunfähigkeit kamen noch ca. 8 300 € hinzu (Ruof et al. 2003). Darüber hinaus sind nach einer Erkrankungsdauer von 20 Jahren ca. 80% der RA-Patienten nicht mehr arbeitsfähig (Scott et al. 1987).

Die RA ist charakterisiert durch schubweise und symmetrisch auftretende, schmerzhaft Entzündungen der Gelenke. In erster Linie sind hiervon die kleinen diarthroiden Gelenke der Hände und Füße betroffen, in denen eine fortschreitende Zerstörung des Knorpel- und Knorpelgewebes stattfindet. Im weiteren Krankheitsverlauf kann dies zu Deformitäten und vollkommenem Funktionsverlust der Gelenke führen (Kinne et al. 1997). Einige Patienten erleiden weiterhin systemische und extraartikuläre Manifestationen wie Anämie, Vaskulitis, Serositis, Amyloidose, Osteoporose, Felty-Syndrom, Myokarditis und Rheumaknoten (O'Gradaigh et al. 2000). Weiterhin tragen RA-Patienten ein höheres Risiko von Begleiterkrankungen. Dies führt zu einer um 3-18 Jahre verringerten Lebenserwartung (Pincus und Callahan 1986).

Die RA wird als eine Autoimmunerkrankung angesehen, deren Pathogenese trotz intensiver Forschung noch immer ungeklärt ist. Ein auslösendes Agens konnte bis heute nicht identifiziert werden. Diskutiert werden sowohl endogene Antigene, z. B. Kollagen II oder Hitzeschockproteine (Firestein 2003), als auch exogene Antigene, z. B. das Epstein-Barr-Virus oder das Röteln-Virus (Maini 2003). Für die Entstehung der Erkrankung wird die molekulare Mimikry als ein möglicher Mechanismus angesehen. Dabei reagiert der Organismus aufgrund ähnlicher bzw. identischer Epitope des Antigens und körpereigener Zellen mit der Produktion von kreuzreaktiven Auto-Antikörpern (Kinne et al. 1997). Zudem ist eine genetische Prädisposition für die RA wahrscheinlich. Diese Prädisposition zeigt sich z. B. daran, dass die Erkrankung mit Polymorphismen bestimmter HLA (*human leukocyte antigen*)-DR-Gene assoziiert ist (Calvo und Alarcón 2000).

2.1.1 Veränderungen am Gelenk und an der Synovialmembran in der RA

In der RA steht die schmerzhafteste Synovitis der Gelenke mit fortschreitender Destruktion von Knorpel- und Knochengewebe im Vordergrund. Es können generell alle diarthroiden Gelenke des Körpers betroffen sein, wobei jedoch vorwiegend die Hände und Füße befallen sind.

Diarthroide Gelenke zeichnen sich durch zwei gegenüberliegende Knochenenden aus, deren Gelenkflächen mit hyalinem Knorpel bedeckt sind (Abb. 1). Die beiden Knochen sind durch die Gelenkkapsel miteinander verbunden. Diese wird zum Gelenkspalt hin von der Synovialmembran (SM) ausgekleidet. Sie ist gekennzeichnet durch die ein- bis zweilagige Deckzellschicht, ein reiches Gefäßbett, Lymphgefäße und Nervenfasern. Weiterhin bilden die Zellen der SM die Synovialflüssigkeit (SF) (Lydyard und Edwards 1994).

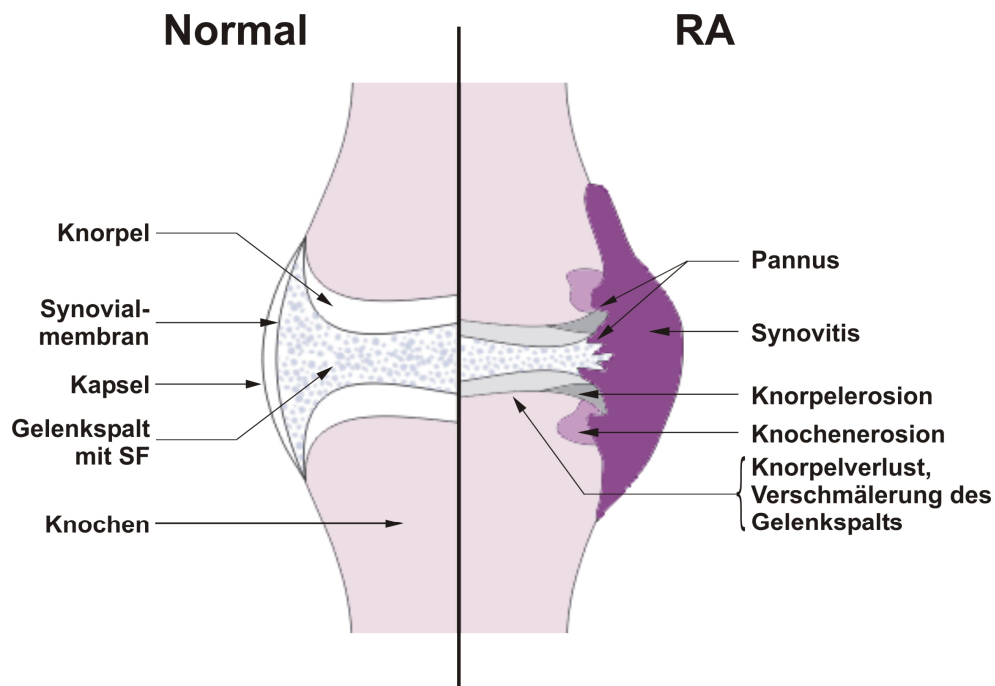


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung eines normalen diarthroiden Gelenks (links) und der Veränderungen in der RA (rechts)

Links ist der Aufbau eines normalen diarthroiden Gelenks schematisch dargestellt. Die zwei Knochenenden sind durch die Gelenkkapsel miteinander verbunden. Die Gelenkkapsel ist innen mit der Synovialmembran ausgekleidet. Der Gelenkspalt zwischen den mit Knorpel bedeckten Knochenenden ist mit SF gefüllt. Rechts sind in der RA auftretende Gelenkveränderungen wie Synovitis, Pannus, Knorpel- und Knochenerosionen dargestellt.

RA = rheumatoide Arthritis; SF = Synovialflüssigkeit

Im Verlauf der RA kommt es zunächst zu einer Verdickung der Gelenkkapsel und der Weichteile, die das Gelenk umgeben. Nachfolgend erodiert der Gelenkkörper (Gelenkknorpel und

-knochen), und der Gelenkspalt verschmälert sich. Diese Prozesse können letztlich die vollkommene Destruktion und Subluxation des Gelenkkörpers verursachen und eine knöcherne Ankylose in Fehlstellung herbeiführen. Dies bedeutet einen erheblichen Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes (Kraan et al. 2002).

Die Zerstörung der Gelenke geht dabei von der SM aus. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu histologischen Veränderungen im Gelenk. Es treten eine massive Verbreiterung der Deckzellschicht (Hyperplasie), eine verstärkte Vaskularisierung, diffuse entzündliche Infiltrate und lymphozytäre Aggregate auf (Abb. 2). Die Destruktion des Gelenkknorpels und -knochens in der RA beginnt dabei an der Ansatzstelle der SM am Gelenkknorpel und -knochen. Die hyperplastische SM überwächst nachfolgend als so genannter Pannus den Gelenkknorpel und infiltriert anschließend den Gelenkknorpel sowie den subchondralen Gelenkknochen (Maini 2003).

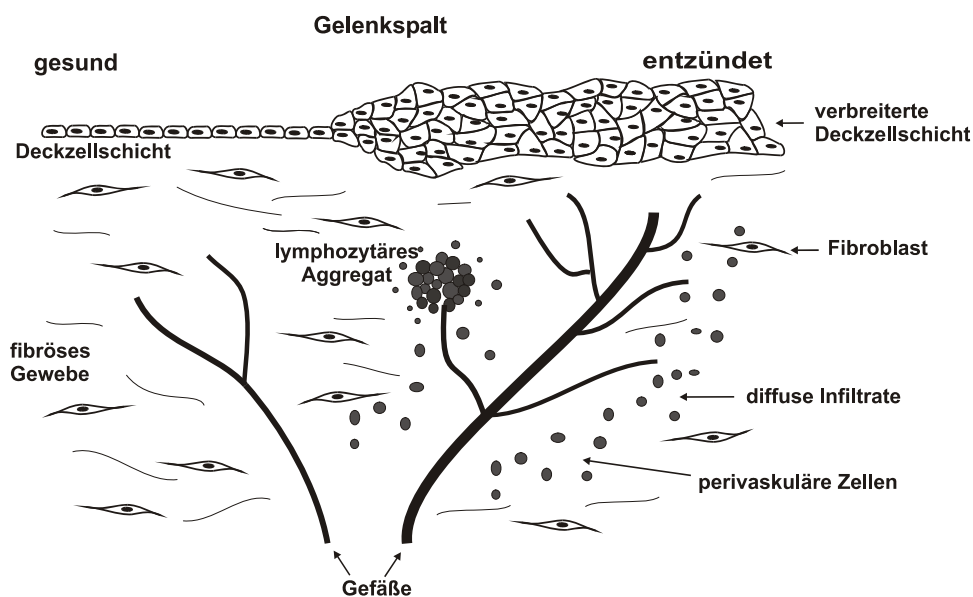


Abb. 2: Schematische Darstellung der gesunden und der entzündeten SM

Die linke Seite der Abbildung zeigt den Aufbau einer gesunden SM (Synovialmembran). Auf der rechten Seite sind die wichtigsten Veränderungen in einer entzündeten SM dargestellt: stark verbreiterte Deckzellschicht, zunehmende Vaskularisierung sowie Bildung von lymphozytären Aggregaten und diffusen Infiltraten (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. E. Kunisch, nach Mohr 1984).

Entscheidend beteiligt an der inflammatorischen Gelenkzerstörung in der RA sind u. a. folgende Zelltypen (Firestein 2003, Kinne et al. 2000, Pap et al. 2000c):

- synoviale Fibroblasten, u. a. durch die Synthese von proteolytischen Enzymen, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Apoptose-Inhibitoren sowie durch ihr aggressives und infiltratives Wachstum;

- synoviale Makrophagen, u. a. durch die Antigenpräsentation sowie durch die Synthese von proteolytischen Enzymen und Zytokinen;
- CD4⁺ (*cluster of differentiation*) T-Zellen, u. a. durch die Aktivierung der synovialen Fibroblasten und Makrophagen sowie durch die Produktion von Zytokinen;
- B-Zellen, u. a. durch Antigenpräsentation sowie durch die Synthese von Antikörpern und Zytokinen.

Die beiden erstgenannten Zelltypen werden nachfolgend eingehender betrachtet.

2.1.2 Synoviale Zellen in der RA

Hauptsächlich zwei nicht-lymphoide Zelltypen können sowohl in der hyperplastischen Deckzellschicht der SM als auch an der Knorpel-Pannus-Grenze in der RA identifiziert werden: Synoviale Typ-A- und Typ-B-Zellen. Zu welchen Anteilen diese beiden Zelltypen zu Beginn und im Verlauf der RA beteiligt sind, wird in der Literatur recht kontrovers diskutiert (Burmester et al. 1997, Kinne et al. 1995, Zvaifler und Firestein 1994).

2.1.2.1 Synoviale Makrophagen in der RA

Synoviale Typ-A-Zellen exprimieren MHC-II (*major histocompatibility complex-II*), CD14, CD68 und unspezifische Esterase, weshalb sie der monozytären Zelllinie zugeordnet werden (Zvaifler 1995). Diese auch als synoviale Makrophagen bezeichneten Zellen exprimieren in der RA die für die Antigenpräsentation bedeutsamen MHC-II-Moleküle und sezernieren für die Zellmigration wichtige Chemokine wie IL (Interleukin)-8 oder MIP-1 (*macrophage inflammatory protein-1*). Weiterhin tragen sie durch die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF (Tumornekrosefaktor)- α zum Entzündungsgeschehen bei und sind durch die Synthese proteolytischer Enzyme, z. B. Kollagenase und Stromelysin, auch an der Knorpel- und Knochendestruktion beteiligt. Synoviale Makrophagen werden jedoch nicht als die Hauptverursacher der Destruktion angesehen, sondern nehmen in der pathologischen Kaskade der RA möglicherweise eine Verstärkerrolle ein, indem sie synoviale Typ-B-Zellen aktivieren (Kinne et al. 2000).

2.1.2.2 Synoviale Fibroblasten (SFB) in der RA

Der zweite Zelltyp der synovialen Zellen, der maßgeblich zur Gelenkdestruktion beiträgt, sind die synovialen Typ-B-Zellen oder - wie sie im Folgenden genannt werden - synoviale Fibroblasten (SFB). Sie zeichnen sich durch die Abwesenheit der T-Zell- und Monozyten/Makrophagenmarker CD3 und CD14 aus. Als ein weiterer Marker für SFB wurde CD90 (Thy-1) beschrieben (Saalbach et al. 1998). Zudem zeigen SFB eine starke Expression der Prolyl-4-Hydroxylase, einem zentralen Enzym der Kollagensynthese, und synthetisieren in hohem Maße Kollagene (Zimmermann et al. 2001).

RA-SFB zeichnen sich durch einen aktivierten Phänotyp aus (Davis 2003, Firestein 1996, Kinne et al. 1995, Pap et al. 2000c). Dieser aktivierte Phänotyp ist zum einen durch eine veränderte Morphologie der Zellen mit großem blassen Nukleus, mehreren prominenten Nukleoli und reichlich Zytoplasma charakterisiert (Davis 2003, Kinne et al. 1995). Daneben ist der aktivierte Phänotyp durch einen Verlust der Kontaktinhibierung und eine erhöhte Sekretion von matrixdegradierenden Enzymen und Zytokinen gekennzeichnet, die den Entzündungsprozess, die Vaskularisierung sowie die Knorpel- und Knochendestruktion fördern (Davis 2003, Firestein 1996). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass die durch aktivierte RA-SFB vermittelte Gewebsinvasion nicht auf deren Proliferation zurückzuführen ist. Vielmehr kommt sie durch deren gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, matrixdegradierenden Enzymen und Apoptose-Inhibitoren zustande (Seemayer et al. 2003). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass SFB inhibierend auf die Apoptose von synovialen T-Zellen und B-Zellen wirken (Pap et al. 2000c).

Insbesondere in RA-SFB konnte auch eine veränderte Expression einer Vielzahl von Proliferation- und Apoptose-regulierenden Genen nachgewiesen werden. So wurde in RA-SFB eine erhöhte Expression von Proto-Onkogenen wie c-fos, c-jun, jun-B, egr-1 (*early growth response factor-1*) und c-myc gefunden (Davis 2003, Kinne et al. 1995). Diese „immediate-early response“ Gene werden nach Stimulation innerhalb kürzester Zeit verstärkt exprimiert und danach sehr schnell wieder herunterreguliert. Bei lang anhaltender, starker Stimulierung der SFB sind diese Moleküle allerdings über längere Zeit nachweisbar. Unter diesen Genen stellt c-myc ein entscheidendes Signal dar, weil es als ein Schlüsselenzym die Zellproliferation initiiert (Firestein 1996). Das Proto-Onkogen c-fos ist insofern bemerkenswert, als die Expression dieses Gens auch bei mehrfach passagierten RA-SFB weiterhin stark erhöht ist (Zimmermann et al. 2001).

Interessanterweise konnte eine Apoptose-Resistenz der RA-SFB bei Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegt werden. Demzufolge weisen RA-SFB eine veränderte Expression von anti-apoptotischen Molekülen wie Sentrin und bcl-2 oder Tumorsuppressorgenen wie PTEN, p16 und p53 auf (Franz et al. 2000, Pap et al. 2000a, Perlman et al. 2000, Taniguchi et al. 1999).

In der RA-SM und in RA-SFB wurden im Tumorsuppressorgen p53 Mutationen detektiert (Yamanishi et al. 2002a). Einige dieser Mutationen von p53 resultieren in einem dominant-negativen Phänotyp und hemmen somit die ursprüngliche Funktion des Gens. Diese Hemmung von p53 in RA-SFB erhöht deren Invasivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von p53 in SFB aus gesunder SM einen aktivierten Phänotyp induziert, der viele Merkmale von RA-SFB zeigt (Davis 2003).

Diese Mutationen in funktionellen Schlüsselgenen könnten Folge retroviraler Infektionen in SFB sein. Die resultierende Aktivierung von Proto-Onkogenen würde dann eine erhöhte Expression matrixdegradierender Enzyme bewirken. Überdies würde eine verstärkte Zytokinfreisetzung der RA-SFB zur Stimulierung von Makrophagen und T-Zellen führen (Firestein 1996). Diese Erklärungsmodelle unterstreichen eine mögliche initiale Rolle der SFB bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der RA (Abb. 3).

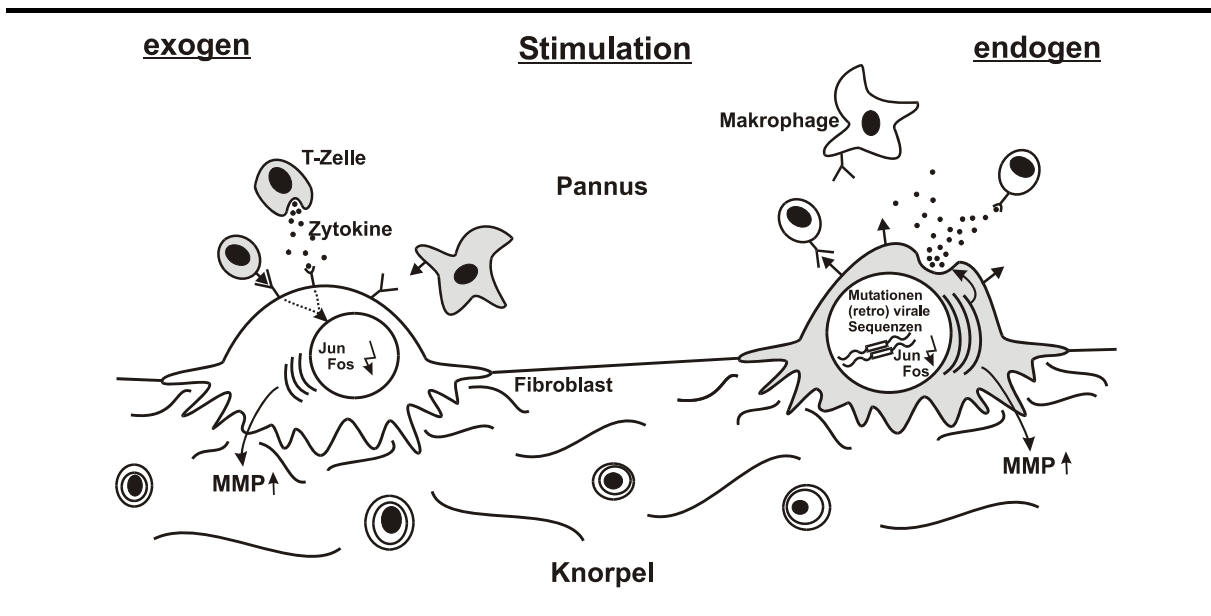


Abb. 3: Schema zu den möglichen Ursachen der Aktivierung von Fibroblasten in der RA-SM

Bei einer exogenen Stimulation (linke Seite) werden SFB von Makrophagen und T-Zellen durch erhöhte Zytokinfreisetzung und Zell-Zell-Kontakt aktiviert. Sie reagieren darauf mit einer erhöhten Expression von Proto-Onkogenen und MMP. Bei der endogenen Aktivierung von SFB (rechte Seite) werden Mutationen in Schlüsselgenen oder retrovirale Infektionen als Gründe für eine erhöhte Expression von Proto-Onkogenen und MMP angenommen (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. E. Kunisch, nach Kinne 1999).

MMP = Matrixmetalloproteinasen; RA = rheumatoide Arthritis; SM = Synovialmembran; SFB = synoviale Fibroblasten

2.2 IL-1 β , TNF- α und PDGF in der RA

2.2.1 Bedeutung von IL-1 β in der RA

Seit IL-1 in den Siebziger Jahren als eines der ersten Zytokine in der Rheumatologie Beachtung fand (Dayer 2002), hat sich seine große Bedeutung bei einer Vielzahl physiologischer Antworten gezeigt (Watkins et al. 1999).

Aktives IL-1 β hat ein Molekulargewicht von 17 kDa und wird größtenteils von Monozyten und Makrophagen synthetisiert, aber auch von Endothelzellen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen (Koch et al. 1995). Für IL-1 β existieren zwei membranständige Rezeptoren: IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) und IL-1-Rezeptor Typ II (IL-1RII) (McMahan et al. 1991, Sims et al. 1988). IL-1 β bildet mit IL-1RI einen Signaltransduktionskomplex aus, der die physiologische Wirkung von IL-1 β vermittelt (Sims et al. 1993). Die Bindung von IL-1 β an IL-1RII führt hingegen zu keiner Signaltransduktion. IL-1RII stellt somit als so genannter *decoy*-Rezeptor einen natürlichen Antagonisten von IL-1 β dar (Colotta et al. 1993).

Die überragende Bedeutung von IL-1 β in der RA ist durch zahlreiche Befunde belegt. So zeigten Eastgate et al., dass die Menge von zirkulierendem IL-1 β im Serum mit dem Ausprägungsgrad der Krankheit korreliert (Eastgate et al. 1988, Smeets et al. 2003). Erhöhte IL-1 β -Spiegel finden sich dabei auch in der SF von RA-Patienten (Firestein et al. 1990). Hier nimmt IL-1 β u. a. eine wichtige Rolle in der Chemotaxis ein. So ist nach Zugabe von anti-IL-1-Antikörpern zur RA-SF eine verminderte chemotaktische Aktivität auf T- und B-Zellen nachweisbar (Miossec et al. 1986). Hierbei induziert IL-1 β z. B. Interleukin-8 und weitere Entzündungsmediatoren wie NO (Stickstoffmonoxid) und PGE₂ (Prostaglandin E₂) (Alvaro-Gracia et al. 1990). In synovialen Zellen der SM von RA-Patienten lässt sich IL-1 β auf mRNA (*messenger ribonucleic acid*)-Ebene nachweisen (Buchan et al. 1988), und die Menge von IL-1 korreliert mit arthroskopischen und radiologischen Veränderungen in der RA (Miyasaka et al. 1988). Weiterhin induziert IL-1 die Bildung von gewebsdegradierenden Enzymen, insbesondere der Matrixmetalloproteinase (MMP)-1 und MMP-3 (Dayer et al. 1986, DiBattista et al. 1995).

Weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von IL-1 in der Arthritis ließen sich anhand von Tiermodellen und Therapiestudien in der humanen RA mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) gewinnen. So kann im Tiermodell nach der therapeutischen Gabe von IL-1Ra eine

verminderte Erosion der Knorpel- und Knochenmatrix beobachtet werden (Joosten et al. 1996, van Lent et al. 1995). Im Modell der SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Maus wird durch IL-1Ra-Gentransfer in SFB die Erosion von Knorpelgewebe verhindert (Müller-Ladner et al. 1997). Diese Effekte wurden bei Therapiestudien mit IL-1Ra in der humanen RA bestätigt, indem radiologisch eine verlangsamte Progression der Gelenkzerstörung festgestellt wurde (Bresnihan et al. 1998, Campion et al. 1996).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IL-1 β eine Reihe von Reaktionen in SFB verursacht, wie beispielsweise eine erhöhte Synthese inflammatorischer Zytokine, eine unausgewogene Produktion von MMP und TIMP sowie eine Dysregulation der Apoptose (Jeong et al. 2004).

2.2.2 Bedeutung von TNF- α in der RA

Mitte der Siebziger Jahre fand man nach intravenöser LPS (Lipopolysaccharide)-Injektion im Mausserum einen Faktor, der Nekrosen in Tumoren induziert; diesen Faktor nannten Carswell et al. Tumornekrosefaktor (TNF) (Carswell et al. 1975).

TNF- α ist ein weiteres Zytokin, das in der Pathogenese der RA eine zentrale Rolle einnimmt. Er wird in der RA hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert. Neu synthetisierter TNF- α liegt zunächst membrangebunden vor und wird durch enzymatische Abspaltung freigesetzt. Das aktive, lösliche Molekül hat ein Molekulargewicht von 17 kDa und ist aus drei identischen Untereinheiten aufgebaut. TNF- α ist ein Hauptmediator bei entzündlichen, immunologischen und pathophysiologischen Reaktionen. Die Reaktion der Zielzellen auf TNF- α ist sehr unterschiedlich. So kann sowohl Apoptose als auch Proliferation induziert werden und eine veränderte Expression einer Vielzahl von Genen verursacht werden, z. B. von Zytokinen oder matrixdegradierenden Enzymen (Choy und Panayi 2001, Kaufman und Choi 1999).

TNF- α entfaltet seine biologische Wirkung über zwei membranständige Rezeptoren, den TNF-Rezeptor I (Molekulargewicht 55 kDa; TNF-RI, p55 oder CD120a) und den TNF-Rezeptor II (Molekulargewicht 75 kDa; TNF-RII, p75 oder CD120b). Wenngleich beide Rezeptoren in ihren extrazellulären Domänen eine Homologie von ca. 28% aufweisen, zeigen ihre intrazellulären Domänen keinerlei Ähnlichkeit. Zudem fehlt dem TNF-RII die so genannte *death domain*, welche die Induktion der Apoptose vermittelt. Aufgrund der verschiedenen intrazellulären Domänen beider Rezeptoren führen die jeweiligen Signaltransduktionswege zu

unterschiedlichen biologischen Antworten in den Zielzellen (Choy und Panayi 2001, Kaufman und Choi 1999).

Der am besten untersuchte Aspekt von TNF- α ist dessen pro-inflammatorische Wirkung. So induziert TNF- α die Produktion anderer entzündlicher Zytokine, z. B. IL-1, IL-6, IL-8, und GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) (Choy und Panayi 2001). Die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch synoviale Zellen lässt sich durch Zugabe von anti-TNF- α -mAk (monoklonale Antikörper) hemmen (Butler et al. 1995). Ferner korreliert das Ausmaß der Knorpel- und Knochendestruktion in den entzündeten Gelenken von RA-Patienten positiv mit dem TNF- α -Spiegel in der SF (Neidel et al. 1995). Sowohl TNF- α als auch beide TNF-Rezeptoren lassen sich mittels immunhistologischer Untersuchungen in der SM von RA-Patienten nachweisen (Alsalameh et al. 1999). Beide Rezeptoren lassen sich auch auf isolierten RA-SFB detektieren; der TNF-RI wird dabei stärker von den Zellen exprimiert (Butler et al. 1994, Alsalameh et al. 2003).

Die herausragende Bedeutung von TNF- α in der RA wird auch in klinischen anti-TNF-Therapiestudien belegt. Dabei kommen u. a. anti-TNF- α -mAk oder TNF- α -Rezeptorfusionsproteine zum Einsatz. Anti-TNF- α -Studien zeigen eine Abnahme der Gelenkschwellung und des C-reaktiven Proteins (CRP), eines Akute-Phase-Proteins (Elliott et al. 1994). Während der Therapie sinken zudem die Serumkonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 (Lorenz et al. 1996) und der gewebsdegradierenden Enzyme MMP-1 und MMP-3 (Brennan et al. 1997). Ebenso beobachtet man eine Reduktion von Adhäsionsmolekülen in der SM (Paleolog et al. 1996). Studien mit TNF- α -Rezeptorfusionsproteinen zeigen radiologisch eine Abnahme der Gelenkschwellung, eine Verminderung der Krankheitsaktivität (Moreland et al. 1999) und eine verlangsamte Progression der Gelenkzerstörung (Spencer-Green 2001).

2.2.3 Bedeutung von PDGF in der RA

Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) wurde erstmalig Mitte der Siebziger Jahre als ein Bestandteil des Serums entdeckt und aus humanen Thrombozyten gereinigt. Heute weiß man, dass PDGF von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen synthetisiert werden kann (Heldin und Westermark 1999).

PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der in der RA eine große Rolle spielt. Als potentes Mitogen für die SFB-Proliferation soll er im Verlauf der RA zur Hyperplasie der SM beitragen. PDGF ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa (Heldin und Westermark 1999, Remmers et al. 1991b). Er besteht aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Peptidketten, der A- und der B-Kette bzw. der kürzlich entdeckten C- oder D-Kette. Aus diesen Ketten können sich die physiologisch aktiven Isoformen PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD bilden (Fredriksson et al. 2004). Für PDGF wurden zwei membranständige Rezeptoren identifiziert: der α -Rezeptor (ca. 170 kDa), der die A-, B- oder C-Kette des PDGF bindet, und der β -Rezeptor (ca. 180 kDa), der die B- oder D-Kette binden kann (Fredriksson et al. 2004). Beide Rezeptoren interagieren in ähnlicher Affinität mit PDGF-BB und werden von Fibroblasten exprimiert, der β -Rezeptor jedoch in höherem Maße. Nach Bindung des dimeren PDGF an zwei PDGF-Rezeptoren entsteht ein Rezeptordimer, dessen α/β -Rezeptorkombination sich nach der Isoform des PDGF richtet. Dies löst intrazellulär eine gegenseitige Phosphorylierung des Rezeptordimers mit nachfolgender Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden aus, was schließlich zur Synthese von DNA (*deoxyribonucleic acid*) führt. Ferner bewirkt die Aktivierung der PDGF-Rezeptoren durch den aus A- und/oder B-Ketten bestehenden PDGF-Dimer in Fibroblasten ein gesteigertes Zellwachstum, Veränderungen der Zellform und Motilität sowie Apoptose-Inhibierung. Zudem wirken diese PDGF-Dimere chemotaktisch auf Fibroblasten, Monozyten sowie neutrophile Granulozyten und stimulieren die Produktion von Matrixproteinen (Heldin und Westermark 1999, Remmers et al. 1991b).

Die Aktivität von PDGF lässt sich sowohl in RA- (Remmers et al. 1990) als auch in Osteoarthritis (OA)- und Gelenktrauma (GT)-SFB (Hamerman et al. 1987) nachweisen, wobei PDGF in der RA-SM in deutlich größeren Mengen als in der OA-SM oder der normalen, nicht-entzündeten SM zu finden ist (Remmers et al. 1991a). Weiterhin produzieren Zellen aus Pannusläsionen mehr PDGF als solche aus Arealen ohne Pannusbildung (Firestein und Zvaifler 2002). Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Detektion hoher Spiegel von PDGF-Rezeptoren in der RA-SM, nicht aber in der normalen, nicht-entzündeten SM (Rubin et al. 1988).

Die starke mitogene Aktivität der RA-SF wird durch anti-PDGF-Antikörper *in vitro* signifikant inhibiert (Remmers et al. 1990). Die mitogene Wirkung von PDGF ist auch an SFB belegt, die direkt aus der Primärkultur isoliert worden sind, um möglichst dem *in vivo* Phäno-

typ zu entsprechen (Zimmermann et al. 2001). Es ist somit davon auszugehen, dass PDGF durch seine starke mitogene Wirkung einen wichtigen Stimulationsfaktor bei der Synovialhyperplasie in der RA darstellt.

PDGF induziert in RA-SFB die Sekretion von Cathepsin B, während es die Sekretion von Cathepsin L nicht verändert (Lemaire et al. 1997). Hiraoka et al. zeigten, dass PDGF die Sekretion von MMP-1 in RA-SFB auf Proteinebene stimuliert (Hiraoka et al. 1992), während Kumkumian et al. berichteten, dass die durch IL-1 induzierte Expression von MMP-1 in RA-SFB mittels PDGF gehemmt werden kann (Kumkumian et al. 1989).

Über die physiologische Rolle der zuletzt entdeckten C- und D-Kette ist bisher nur wenig bekannt (Betsholtz 2003, Li und Eriksson 2003). Es finden sich allerdings Hinweise, dass PDGF-CC bei der ischämisch induzierten Angiogenese von Bedeutung ist (Dimmeler 2005). Unsere Arbeitsgruppe konnte die Expression der C- und D-Kette in SFB und in Makrophagen aus der RA- und OA-SM nachweisen. Dabei fand sich ein höherer Proteinspiegel der D-Kette in der RA-SM im Vergleich zur OA-SM (Pohlers et al. 2005).

2.3 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

2.3.1 Bedeutung der MMP bei physiologischen und pathologischen Prozessen

Im Jahr 1962 beschrieben Gross und Lapière bei Versuchen an Fröschen in der Metamorphose ein Enzym, das Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) degradieren konnte (Gross und Lapière 1962). In der Folgezeit wurde dieses Enzym Kollagenase genannt, und es schloss sich eine Vielzahl von Untersuchungen über proteolytische Enzyme an, die für Umbauvorgänge in verschiedenen Geweben verantwortlich sind. Heute sind mehr als 200 Metalloproteinasen bekannt, die anhand ihrer dreidimensionalen Konformation und molekularen Struktur in 40 verschiedene Gruppen unterteilt werden. Dabei beinhaltet die Gruppe M10 die Familie der MMP (Curry und Osteen 2003).

Die MMP sind für den kontrollierten Ab- bzw. Umbau der EZM in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen verantwortlich (Tab. 1) (Ries und Petrides 1995). Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den MMP und ihren Inhibitoren, die aus einer übermäßigen Erhö-

hung der Synthese, einer unkontrollierten Aktivierung oder einer mangelnden Inhibierung der MMP resultieren kann, führt über den unkontrollierten Abbau der EZM zu bestimmten pathologischen Prozessen. Hierzu zählen u. a. die RA, die OA, die Atherosklerose, die Herzinsuffizienz, Fibrosierungen und das Lungenemphysem (Tab. 1) (Bode und Maskos 2003). Weiterhin werden auch das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren auf eine Fehlregulation von MMP zurückgeführt (Overall und Lopez 2002). Die metastasierenden Zellen müssen dabei die Fähigkeit aufweisen, durch das Stroma, die Basalmembran und das Endothel von Gefäßen zu dringen. In der Tat konnte eine positive Korrelation zwischen der Invasivität von Tumorzellen und der MMP-Synthese nachgewiesen werden (Sato et al. 1992).

Tab. 1 : Beispiele für physiologische und pathologische Prozesse, bei denen Matrixmetalloproteinasen am Umbau der Extrazellulärmatrix beteiligt sind (nach Ries und Petrides 1995)

Physiologische Prozesse	Pathologische Prozesse
<ul style="list-style-type: none"> • Wundheilung • Angiogenese • Entwicklung und Umbau von Knochengewebe • Funktionen von Makrophagen und Neutrophilen • Zahndurchbruch • Morphogenese der Speicheldrüse • Ovulation • Zyklischer Umbau der Gebärmutterschleimhaut • Schwangerschaft • Laktation • Implantation des Trophoblasten • Embryogenese 	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorwachstum und -metastasierung • Rheumatoide Arthritis • Osteoarthritis • Lungenfibrose • Leberzirrhose • Atherosklerose • Aortenaneurysma • Glomerulonephritis • Erkrankungen des Zahnfleisches • Otosklerose • Ulcus ventriculi

2.3.2 Untergliederung und Struktur der MMP

Derzeit umfasst die Familie der MMP ca. 25 Zink-abhängige, extrazelluläre Endopeptidasen. In ihrer Gesamtheit können sie bei neutralem pH-Wert *in vitro* und *in vivo* alle Bestandteile der EZM degradieren (Bode und Maskos 2003). Hinsichtlich ihrer molekularen Struktur und ihrer Substratspezifitäten, die sich teilweise überschneiden, werden die MMP in sechs Untergruppen eingeteilt: die Kollagenasen, die Gelatinasen, die Stromelysine, die Matrilysine, die Membran-Typ MMP (MT-MMP) und andere MMP (Tab. 2) (Murphy et al. 2002).

Tab. 2: Aufstellung nach Untergruppen der Matrixmetalloproteinasen

MMP	MW (kDa)			Matrixsubstrate
	Zymogen		proz. Form	
Kollagenasen				
Kollagenase-1	MMP-1	55	45	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X; Aggrekan; Gelatine; Laminin; Fibronektin
Kollagenase-2	MMP-8	75	58	
Kollagenase-3	MMP-13	60	48	
Kollagenase-4	MMP-18	55	42	Kollagen I, II, III; Gelatine
Gelatinasen				
Gelatinase A	MMP-2	72	66	Kollagen IV, V, VII, X, XI; Gelatine; Elastin; Laminin; Nidogen
Gelatinase B	MMP-9	92	86	
Stromelysine				
Stromelysin-1	MMP-3	57	45	Aggrekan; Kollagene III, IV, V, IX, XI; Gelatine; Fibronektin; Laminin; Elastin; Nidogen [α ₁ -Proteinaseinhibitor]
Stromelysin-2	MMP-10	57	44	
Stromelysin-3	MMP-11	51	44	
Matrilysine				
Matrilysin-1	MMP-7	28	19	Kollagen I, IV, X; Aggrekan; Elastin; Laminin; Gelatine; Fibronektin
Matrilysin-2	MMP-26	28	19	
Membran-Typ MMP				
MT1-MMP	MMP-14	66	56	Kollagen I, II, III; Gelatine; Fibronektin; Laminin; Vitronektin
MT2-MMP	MMP-15	72	60	
MT3-MMP	MMP-16	64	52	
MT4-MMP	MMP-17	57	53	
MT5-MMP	MMP-24	63	45	
MT6-MMP	MMP-25	56	38/45	
Andere MMP				
Metalloelastase	MMP-12	54	45	Kollagen IV; Gelatine; Elastin; Laminin
	MMP-19	54	45	Kollagen IV; Gelatine; Laminin; Nidogen
Enamelysin	MMP-20	54	22	Amelogenin
XMMP	MMP-21	70	53	Gelatine
CMMP	MMP-22	52	43	Gelatine; Casein
	(MMP-27)			
CA-MMP	MMP-23	?	?	Gelatine
Epilysin	MMP-28	59	45	Casein

Dargestellt sind die derzeit bekannten Matrixmetalloproteinasen (MMP) mit ihren Molekulargewichten (MW) und Matrixsubstraten (angepasst nach Murphy et al. 2002). Als Zymogen wird die inaktive Vorstufe von Proteasen bezeichnet.

proz. Form = prozessierte Form

Neben den in Tab. 2 aufgeführten Matrixsubstraten spalten MMP zusätzlich Wachstumsfaktor-Rezeptoren, z. B. FGFR (*fibroblast growth factor receptor*)-1 oder EGFR (*epidermal growth factor receptor*), und setzen viele Wachstumsfaktoren aus ihren inaktiven Vorstufen

frei, z. B. TGF (*transforming growth factor*)- α und TGF- β . Weitere MMP-Substrate sind Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und CD44. Die inaktiven Vorstufen von Proteasen werden auch als Zymogene bezeichnet. Die MMP sind in der Lage, andere Zymogene der MMP-Familie und sogar ihre eigene Zymogenform zu schneiden und somit zu aktivieren (Egeblad und Werb 2002).

Hinsichtlich ihrer Struktur werden die MMP in sezernierte MMP und membranassoziierte MMP eingeteilt, wobei die sechs MT-MMP und die MMP-23 der letzteren Gruppe angehören.

Die kleinsten MMP, die beiden Matrilysine MMP-7 und MMP-26, weisen an ihrem N-terminalen Ende ein Signalpeptid auf (Abb. 4), welches bei ihrem Syntheseprozess der Adressierung in das endoplasmatische Retikulum dient. Das darauf folgende Propeptid inaktiviert die Proteinase über eine sterische Hemmung. Dies wird über eine Faltung der Proteinase erreicht, wodurch sich das konservierte Cystein 73 des Propeptids an das katalytische Zink im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne lagern kann. Demzufolge wird die Aktivierung der MMP durch eine proteolytische Abspaltung des Propeptids ausgelöst. Die katalytische Domäne besitzt die charakteristische Zink-Bindungskonsensussequenz HisGluxxGlyHisxxGlyxxHis (HExxGHxxGxxH). Die drei Histidine in dieser Sequenz binden das katalytische Zink. Das in der Konsensussequenz liegende Glutamin bindet ein für die Substratspaltung notwendiges Wassermolekül.

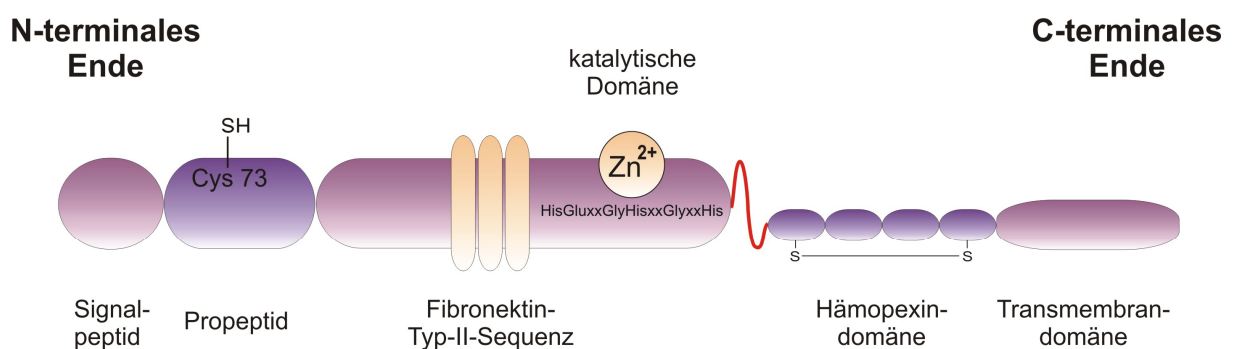


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Matrixmetalloproteinasen mit ihren Domänen

In der Abbildung sind die strukturellen Bausteine der Matrixmetalloproteinasen schematisch dargestellt (nach Egeblad und Werb 2002). Die im laufenden Text beschriebene Inaktivierung des aktiven Zentrums über eine Faltung der Matrixmetalloproteinasen ist nicht dargestellt.

Cys = Cystein; Zn = Zink, S-S = Disulfidbrücke

Die übrigen MMP, mit Ausnahme von MMP-23, besitzen ebenso sämtliche o. g. Domänen. Zudem enthalten diese MMP eine Hämoexindomäne, die durch eine Prolin-reiche „Hinge-Region“ mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Die Hämoexindomäne vermittelt die Interaktion mit Zelloberflächenmolekülen, proteolytischen Substraten und den *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP).

Die katalytische Domäne der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wird durch eine Fibronectin-Typ-II-Sequenz unterbrochen, welche die Gelatinebindung erhöht und eindeutig die Gelatinase-Untergruppe definiert.

Die membranassoziierten MMP werden durch unterschiedliche Strukturen in der Zellmembran verankert. So folgt der Hämoexindomäne der MT-MMP C-terminal eine Transmembrandomäne mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (bei der MMP-14, MMP-15, MMP-16 und MMP-24) bzw. eine hydrophobe Domäne mit einem GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-Anker-Signal (bei der MMP-17 und MMP-25). Die MMP-23 besitzt einen modifizierten N-terminalen Abschnitt, der über einen Signalanker als Membrandomäne fungiert (Bode und Maskos 2003, Pei et al. 2000, Soussi et al. 2003).

Zu den Kollagenasen zählen MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18 (Tab. 2). Sie sind u. a. in der Lage, natives tripelhelikales, fibrilläres Kollagen (z. B. Typ I, II und III) zu spalten. Hiermit sind sie beim Abbau kollagener Matrixbestandteile der EZM bei physiologischen und pathologischen Bedingungen von großer Bedeutung (Visse und Nagase 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-1 *in vitro* bei Tumorerkrankungen mit einer schlechten Prognose einhergeht (Murray et al. 1996, Murray et al. 1998) und in SFB mit der Diagnose RA korreliert (Tolboom et al. 2002). MMP-1 wird von einer Vielzahl von Zelltypen synthetisiert, z. B. Fibroblasten, Chondrozyten, Hepatozyten, Keratinozyten, Monozyten und Makrophagen. Die Synthese von MMP-1 in RA-SFB wird durch IL-1 β , PDGF, EGF (*epidermal growth factor*) und Insulin induziert und durch TGF- β gehemmt (Borghaei et al. 1998, DiBattista et al. 1995, Moore et al. 2000, Sodin-Semrl et al. 2000).

MMP-8 wird vorwiegend von neutrophilen Leukozyten synthetisiert, wurde aber auch in Chondrozyten, SFB und Endothelzellen nachgewiesen (Westermarck und Kahari 1999). Die Expression von MMP-8 wird durch TNF- α , PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Hanemaaijer et al. 1997) und IL-1 β (Stadlmann et al. 2003) induziert.

MMP-13 wurde ursprünglich aus humanem Mammakarzinomgewebe kloniert. Sie weist ein ausgesprochen breites Substratspektrum auf, indem sie z. B. Kollagene, Knorpelkollagene, Laminin, Gelatine, Fibronectin und Aggrekan spalten kann. Die Expression von MMP-13

scheint unter physiologischen Bedingungen auf die Prozesse beschränkt zu sein, bei denen ein schneller Umbau der kollagenen EZM erforderlich ist, wie bei der fetalen Knochenentwicklung und dem postnatalen Knochenumbau (Westermarck und Kahari 1999). Demgegenüber wird die MMP-13 bei pathologischen Veränderungen verstärkt exprimiert, die mit einem exzessiven Abbau der kollagenen EZM verbunden sind (Lindy et al. 1997, Stahle-Backdahl et al. 1997, Vaalamo et al. 1998). Die Expression von MMP-13 wird durch IL-1 β und TNF- α induziert (Liacini et al. 2003, Uria et al. 1997) und scheint mit dem Ausmaß der Entzündung zu korrelieren (Imai et al. 1998, Lindy et al. 1997). Außerdem wird die Synthese von MMP-13 in SFB durch TGF- β erhöht (Moore et al. 2000).

MMP-18 ist die *Xenopus* Kollagenase-4; beim Menschen kommt diese Proteinase nicht vor (Konttinen et al. 1999).

Die beiden Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) werden von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert, z. B. Fibroblasten, Monozyten, Keratinozyten und Tumorzellen. Ihre bedeutendsten Matrixsubstrate sind neben Gelatine auch Nidogen und Laminin. Bemerkenswert ist die Fähigkeit der Gelatinasen, das u. a. in der RA bedeutende proinflammatorische Zytokin IL-1 β in seine aktive Form zu spalten (Schonbeck et al. 1998). Die MMP-2 wird in einem folgenden Kapitel (siehe 2.3.4) detailliert beschrieben. Die Genexpression von MMP-9 wird durch PMA, EGF, IL-1 β , TGF- β und TNF- α stimuliert (Borden und Heller 1997), 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ vermindert die Synthese von MMP-9 (Tetlow und Woolley 1999).

MMP-3 (Stromelysin-1) und MMP-10 (Stromelysin-2) gehören zu den MMP mit den breitesten Substratspektren und können die meisten Bestandteile der EZM wie Gelatine, Laminin, Aggrekan und Fibronectin spalten, nicht jedoch tripelhelikales Kollagen. Sie werden von RA-SFB, nicht aber von GT-SFB synthetisiert (Murphy et al. 2002). MMP-11 (Stromelysin-3) ist proteolytisch nur schwach aktiv und wird intrazellulär durch Furin-Proteinasen aktiviert, wodurch sie sich von den beiden anderen Stromelysinen unterscheidet (Murphy et al. 2002). MMP-11 ist allerdings in der Lage, α 1-Proteinaseinhibitor zu spalten und somit zu inaktivieren (Shapiro 1998).

In der RA wurde sowohl in der SF (Walakovits et al. 1992, Yoshihara et al. 2000) als auch im Serum (Zucker et al. 1999) eine erhöhte Expression von MMP-3 detektiert. Zudem korrelierten die Serumspiegel von MMP-3 mit der Aktivität der Erkrankung (Ribbens et al. 2000). In RA-SFB wurde eine hohe Expression der mRNA von MMP-3 festgestellt. Die Genexpression

von MMP-3 wird in SFB durch TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , PDGF, EGF und Insulin induziert (Borden und Heller 1997, Borghaei et al. 1998, DiBattista et al. 1995, Moore et al. 2000, Sodin-Semrl et al. 2000); MMP-10 wird konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert und wird im Allgemeinen nicht durch dieselben Faktoren wie MMP-3 reguliert (Borden und Heller 1997).

Sowohl MMP-7 (Matrilysin-1) als auch MMP-26 (Matrilysin-2) werden primär in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert, in beschränktem Maße aber auch in normalen Zellen, so im Uterus und in der Plazenta. Auch die Matrilysine sind potente Proteinasen, z. B. ist MMP-26 in der Lage, die Gelatinase MMP-9 zu aktivieren. Die Expression von MMP-7 wird durch PMA, TNF- α , EGF und IL-1 induziert (Borden und Heller 1997, Uria und Lopez-Otin 2000, Zhao et al. 2003b). Die Literaturangaben zur Expression von MMP-7 in der RA-SF sind sehr widersprüchlich (Matsuno et al. 2001, Yoshihara et al. 2000). Bemerkenswert ist, dass die Sequenzanalyse der katalytischen Domäne von MMP-26 eine Homologie von 54% zu derjenigen von MMP-12 und eine Homologie von 51% zu derjenigen von MMP-3 ergab (de Coignac et al. 2000); dennoch zeigen die beiden Matrilysine MMP-7 und MMP-26 in der Aminosäuresequenz keine charakteristischen Motive der übrigen MMP-Untergruppen und werden somit als Matrilysine gesondert aufgeführt (de Coignac et al. 2000).

Die Untergruppe der MT-MMP umfasst inzwischen sechs Proteinasen. Ihnen gemeinsam ist eine C-terminale Transmembrandomäne, mit der sie in der Zellmembran verankert sind. Mit Ausnahme der MMP-25, die hauptsächlich in Leukozyten exprimiert wird, werden die übrigen MT-MMP von vielen Zelltypen synthetisiert. Sie werden bereits intrazellulär durch Furin-ähnliche Serinproteinasen proteolytisch aktiviert. Die MT-MMP spalten als Substrate der EZM die Kollagene I, II und III sowie Fibronektin und Gelatine. Außerdem nehmen sie eine große Rolle bei der Aktivierung anderer MMP-Zymogene ein, insbesondere MMP-14 im Zusammenspiel mit TIMP-2 bei der Aktivierung von proMMP-2 (siehe 2.3.4.2) (Murphy et al. 2002). Die Expression von MMP-14 in RA-SFB erfolgt konstitutiv und wird durch TNF- α (Migita et al. 1996) und IL-1 β (Honda et al. 2001) weiter verstärkt. MMP-15 kann neben proMMP-2 auch proMMP-13 aktivieren und ist in die Prozessierung von TNF- α involviert (Konttinen et al. 1999). Neben der RA sind die MT-MMP auch an weiteren pathologischen Prozessen mit Gewebsinvasion beteiligt, z. B. bei Gehirntumoren oder beim Zervix-Karzinom (Seiki 1999).

Zusammenfassend zeigt sich die große pathogenetische Bedeutung von IL-1 β und TNF- α in der RA u. a. darin, dass sie die Expression von MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 induzieren. PDGF induziert die Expression von MMP-1 und MMP-3. EGF induziert die Expression von MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-9.

Die übrigen sieben MMP werden nicht in die genannten Untergruppen eingeordnet. MMP-12 wird hauptsächlich von Makrophagen synthetisiert (Belaouaj et al. 1995) und ist neben der Spaltung von EZM-Komponenten auch an der Aktivierung anderer MMP-Zymogene beteiligt (Shapiro et al. 1993).

MMP-19 ist in der Lage, die Basalmembranbestandteile Kollagen IV, Nidogen und Laminin zu spalten, daneben aber auch Gelatine und Fibronectin (Stracke et al. 1999). Sie wird in vielen Organen unter physiologischen Bedingungen exprimiert und scheint somit für den normalen Umbau der EZM in den Geweben bedeutsam zu sein (Impola et al. 2003). Von Sedlacek et al. wurde sie als ein Auto-Antigen in der entzündeten RA-SM charakterisiert (Sedlacek et al. 1998).

Die Expression von MMP-20 ist hochspezifisch für Dentalgewebe und scheint eine zentrale Rolle beim Umbau des Zahnschmelzes einzunehmen (Llano et al. 1997).

MMP-21 wurde als ein weiteres Mitglied der Gruppe der MMP in Epithelzellen von sich entwickelnden Geweben und in invasiven Tumorzellen detektiert (Ahokas et al. 2002, Ahokas et al. 2003).

Über MMP-22 und ihre Funktion ist bisher wenig bekannt. Erstmals wurde MMP-22 in Fibroblasten von Hühnern kloniert (Yang und Kurkinen 1998).

MMP-23 ist eine transmembranöse MMP mit strukturellen Besonderheiten (s. o. und Abb. 4, S. 24). Auch sie wurde erst kürzlich kloniert. MMP-23 wird hauptsächlich in den Ovarien, den Testes und der Prostata exprimiert und scheint somit bei Reproduktionsvorgängen von Bedeutung zu sein (Velasco et al. 1999).

MMP-28 ist eine weitere erst kürzlich entdeckte MMP, die vorwiegend in Keratinozyten exprimiert wird (Lohi et al. 2001). Das Expressionsmuster der MMP-28 in gesunder und beschädigter Haut lassen auf eine Funktion in der Gewebshämostase und Wundheilung schließen (Illman et al. 2003, Lohi et al. 2001, Saarialho et al. 2002).

2.3.3 MMP in der RA

Die in der RA auftretenden, charakteristischen Knorpel- und Knochendestruktionen werden auf eine erhöhte Synthese von MMP durch SFB zurückgeführt. Es kommt dabei durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der MMP zu einem verstärkten Abbau der EZM (Konttinen et al. 1999).

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten befasste sich mit dem Nachweis von MMP in der SM von RA-Patienten. Anfangs konnte die Expression von MMP-1 und MMP-3 in der RA-SM nachgewiesen werden (Case et al. 1989, Gravallesse et al. 1991, McCachren et al. 1990). Inzwischen wurde in der RA-SM eine Reihe weiterer MMP lokalisiert. So wurden neben MMP-1 und MMP-3 mittlerweile auch MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 und MMP-19 in der RA-SM detektiert (Goldbach-Mansky et al. 2000, Kolb et al. 1999, Konttinen et al. 1999, Nawrocki et al. 1994, Pap et al. 2000b, Wernicke et al. 1996, Yamanaka et al. 2000). Dabei finden sich in der RA-SM die meisten MMP in der hyperplastischen Deckzellschicht mit Ausnahme von MMP-19, die vorwiegend in Blutgefäßen exprimiert wird (Kolb et al. 1997). Ferner wurde die Kolo-kalisation von MMP-2, MMP-14 und TIMP-2 in der RA-SM untersucht (Konttinen et al. 1999, Yamanaka et al. 2000). In diesen Arbeiten wurde analysiert, inwieweit die Aktivierung von proMMP-2 zur Knorpeldestruktion in der RA beiträgt. Yamanaka et al. wiesen immunhistologisch die Kolo-kalisation von MMP-2, MMP-14 und TIMP-2 und zymographisch die gelatinolytische Aktivität in der Deckzellschicht der RA-SM nach (Yamanaka et al. 2000). Konttinen et al. belegten zusätzlich die Expression von MMP-2, MMP-14 und TIMP-2 an der Knorpel-Pannus-Grenze (Konttinen et al. 1999).

In der RA-SM wurden MMP nicht nur hinsichtlich ihrer Translation in MMP-Protein untersucht, sondern auch bezüglich ihrer Expression auf der RNA (*ribonucleic acid*)-Ebene. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von Konttinen et al. (Konttinen et al. 1999), welche die Genexpression von 16 MMP in der RA-SM der Genexpression in der GT-SM gegenüberstellten. Dabei wurde sowohl in der SM von RA- als auch GT-Patienten MMP-2, MMP-3, MMP-11 und MMP-19 zu einem hohen Prozentsatz gefunden. Folglich wurde auf eine konstitutive Expression dieser MMP geschlossen. MMP-1, MMP-9 und MMP-14 wurden in allen RA-SM beschrieben, in GT-SM jedoch nur in etwa 55-75% der Proben. Ausschließlich in der RA-SM wurden MMP-13 und MMP-15 exprimiert. MMP-8 wurde nur in seltenen Fällen detektiert, und MMP-20 konnte überhaupt nicht nach-

gewiesen werden. MMP-7, MMP-10, MMP-12, MMP-16 und MMP-17 konnten zwar in der RA- und GT-SM detektiert werden, der Nachweis gelang jedoch nicht in allen Proben (Konttinen et al. 1999). Yoshihara et al. (Yoshihara et al. 2000) zeigten im Enzym-Immunoassay höhere Spiegel von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9 in der RA-SF im Vergleich zur OA-SF.

2.3.4 MMP-2 (Gelatinase A)

Die MMP-2 ist eine Proteinase, die in der SM als inaktive Vorstufe (proMMP-2) oder als prozessierte MMP-2 vorliegen kann. Hierzu wird proMMP-2 zunächst aus der synthetisierenden Zelle (z. B. SFB) sezerniert. Um die proMMP-2 in ihre prozessierte Form zu schneiden, ist ein besonderer Aktivierungsmechanismus an der Zelloberfläche (siehe 2.3.4.2) notwendig. Die entstandene prozessierte MMP-2 ist - wenn sie frei vorliegt - proteolytisch aktiv und somit in der Lage, Bestandteile der EZM zu degradieren. Sie kann jedoch auch z. B. von TIMP gebunden und somit inaktiviert werden (Abb. 5) (Goldbach-Mansky et al. 2000).

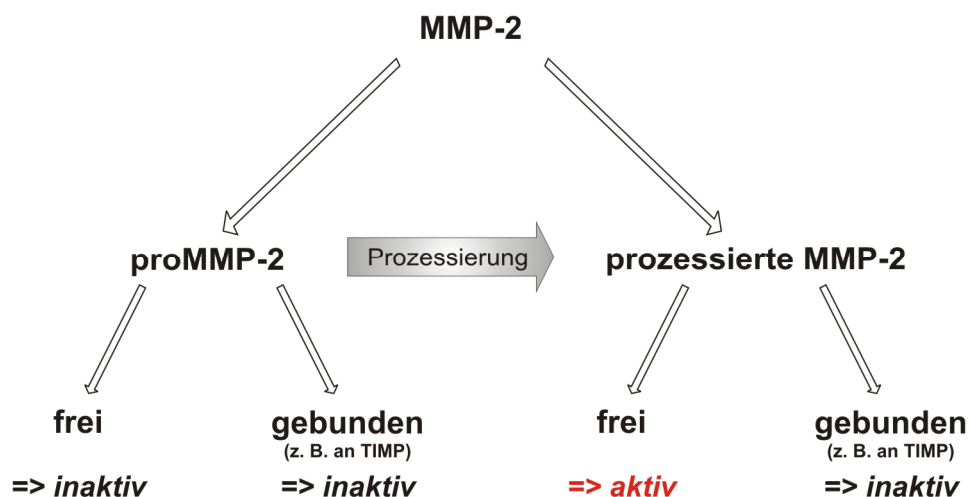


Abb. 5: In der Synovialmembran vorliegende MMP-2-Formen

MMP = Matrixmetalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases

2.3.4.1 Bedeutung der MMP-2

Die MMP-2 (Abb. 6) wurde 1979 entdeckt, als man mit Kollagenasen aus einem invasiven Tumor Degradationsversuche an Kollagen Typ IV durchführte, einem Bestandteil der Basalmembran (Liotta et al. 1979).

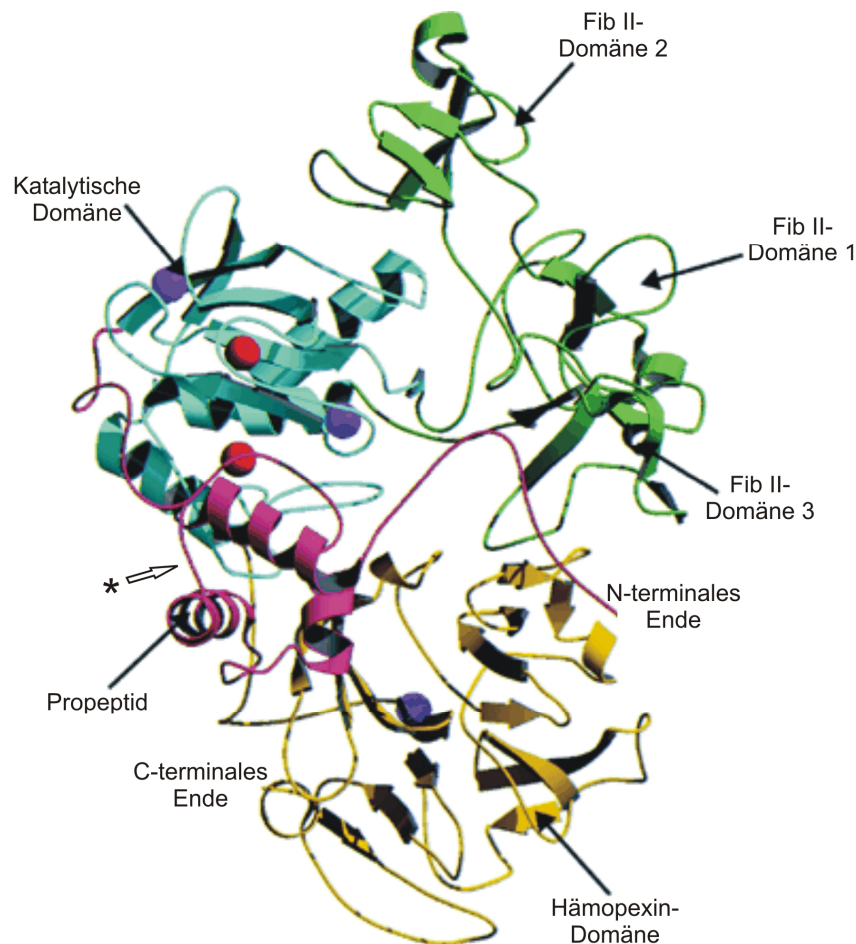


Abb. 6: Dreidimensionale Struktur der proMMP-2

Dargestellt sind das Propeptid, die katalytische Domäne, die Fibronectin-Typ-II-Sequenz (Fib II) und die Hämapexin-Domäne in magenta, türkis, grün bzw. gelb. Zn^{2+} dargestellt in rot, Ca^{2+} in blau. Der Stern kennzeichnet die Schnittstelle für MMP-14. Modifiziert nach Morgunova et al. 1999.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die MMP-2 mit ihrer Fähigkeit, Bestandteile der Basalmembran - vornehmlich Kollagen Typ IV - zu spalten, eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese in der RA (Murphy und Crabbe 1995) und in Tumorerkrankungen (Itoh et al. 1998) einnimmt (Abb. 7). Die MMP-2 ist an verschiedenen Gewebsinvasionen beteiligt (Kleiner und Stetler-Stevenson 1999) und spielt auch in der RA bei der Invasion des Pannus in den angrenzenden Knorpel und Knochen eine tragende Rolle. So wurde in der RA die

Expression der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowohl in der SM als auch an der Pannus-Knorpel- und Pannus-Knochen-Grenze belegt (Konttinen et al. 1998). Weiterhin wurde MMP-2 in erheblicher Menge in der synovialen Deckzellschicht und auch im proliferierenden Stroma nachgewiesen (Goldbach-Mansky et al. 2000). Es wird davon ausgegangen, dass das Ungleichgewicht zwischen den Aktivatoren und Inhibitoren der Gelatinasen erhöhte Aktivitätsniveaus mit gesteigerter Proteolyse und Knochenerosionen zur Folge hat (Konttinen et al. 1998). Patienten mit einer erosiven Erkrankung wie der RA weisen eine deutlich erhöhte Expression von MMP-2 in der SM auf. Zudem korrelieren die hohen Aktivitätslevel der prozessierten MMP-2 in der SM mit dem Auftreten früher Erosionen (Goldbach-Mansky et al. 2000). Darüber hinaus ist die MMP-2 in der Lage, MMP-9 und MMP-13 mittels Proteolyse zu aktivieren (Basset et al. 1997, Murphy und Knäuper 1997, Toth et al. 2003).



Abb. 7: Bedeutung der MMP-2 in der RA

Die Abbildung gibt die in der Literatur beschriebene Relevanz der MMP-2 in der RA wieder.

MMP = Matrixmetalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; RA = rheumatoide Arthritis

2.3.4.2 Regulierung und Aktivierung der proMMP-2

Wie auch die übrigen MMP wird die MMP-2 auf den Ebenen der Genaktivierung und mRNA-Expression, Translation und Sekretion, proteolytischen Aktivierung und Inhibierung reguliert (Abb. 8).

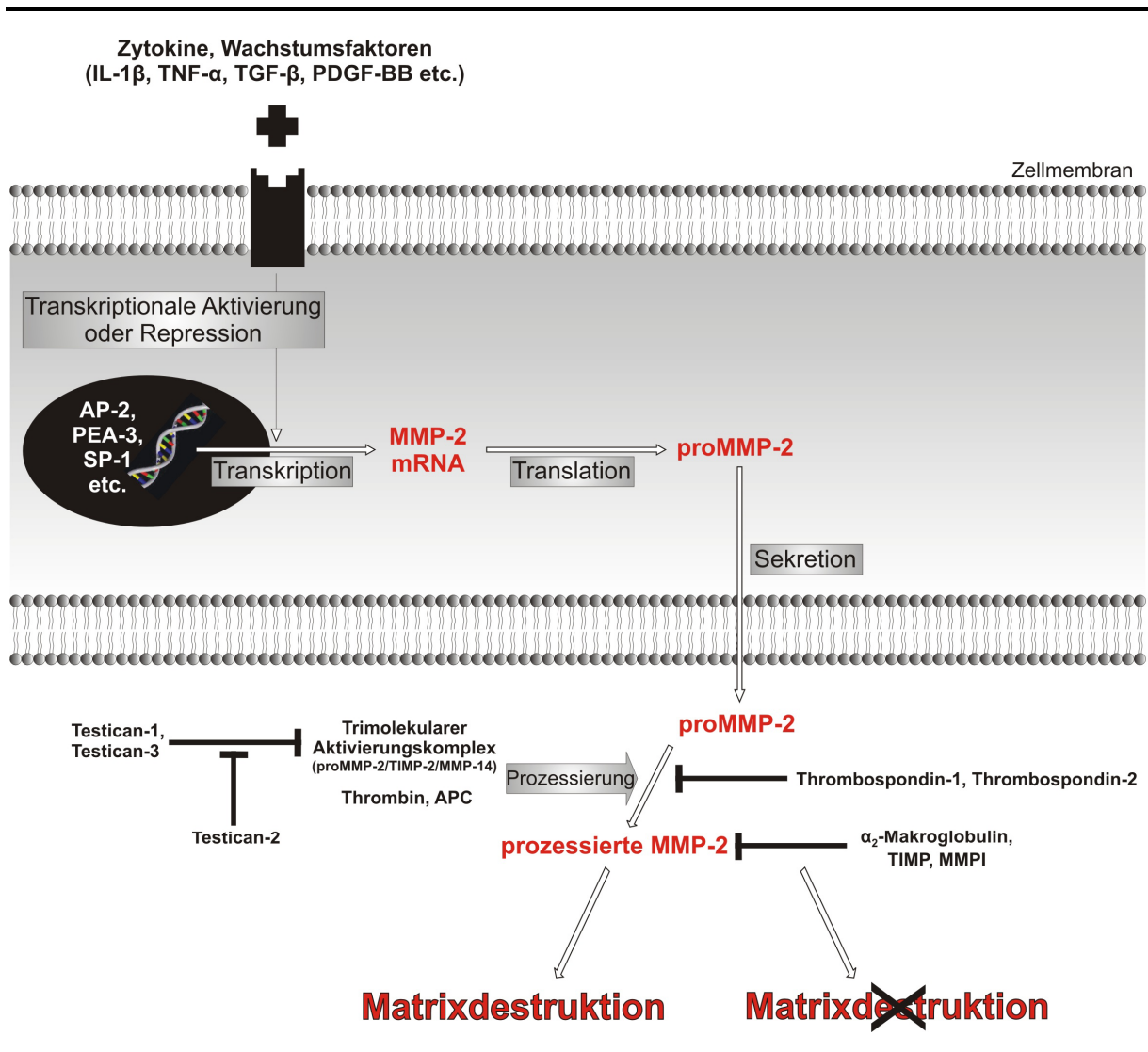


Abb. 8: Vereinfachte Übersicht der Regulationsmechanismen der MMP-2

Dargestellt ist der Syntheseweg der MMP-2 bis zu ihrer gewebsdestruktiven Wirkung mit den verschiedenen Regulatoren und deren Angriffspunkten.

IL-1 β = Interleukin-1 β ; TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α , PDGF-BB = platelet-derived growth factor-BB; TGF- β = transforming growth factor- β ; AP-2 = activator protein-2; PEA-3 = polyoma enhancer A binding protein-3; SP-1 = specificity protein-1; MMP = Matrixmetalloproteinase; mRNA = messenger ribonucleic acid; APC = aktiviertes Protein C; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; MMPI = MMP-Inhibitoren; —| Inhibierung

Die MMP-2-mRNA-Expression wird lediglich durch eine geringe Anzahl von Faktoren moduliert. Die Betrachtung ihres Promotors liefert eine Erklärung für das ungewöhnliche

Expressionsmuster der MMP-2. Der MMP-2-Promotor beinhaltet im Gegensatz zu den Promotoren der meisten MMP keine TATA-Box und keine Bindungsstelle für AP-1 (*activator protein-1*), die für die Induktion durch PMA, Wachstumsfaktoren und Zytokine relevant sind. Er besitzt aber Bindungsstellen für AP-2 (*activator protein-2*), PEA-3 (*polyoma enhancer A binding protein-3*), p53, und SP-1 (*specificity protein-1*). Die Synthese von MMP-2 bleibt nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α , EGF und PMA weitgehend unverändert; TGF- β , welches die meisten MMP herunterreguliert, erhöht die Synthese sowohl von MMP-2 als auch von MMP-9 (Borden und Heller 1997, Overall und Lopez 2002).

Die MMP-2 wird von SFB konstitutiv synthetisiert (Goldbach-Mansky et al. 2000, Okada et al. 1990). Hiraoka et al. (Hiraoka et al. 1992) beschrieben bei Untersuchungen an unstimulierten RA- und GT-SFB, die bis zur 7. Passage kultiviert wurden, eine konstitutive proMMP-2-Produktion. Hierbei synthetisierten die RA-SFB interessanterweise eine größere Menge proMMP-2 als die GT-SFB. Außerdem zeigten die Zellen nach Stimulierung mit PDGF, EGF oder Insulin keine veränderte Syntheseleistung von proMMP-2. Gohji et al. (Gohji et al. 1994) zeigten in Nierenzellkarzinomzellen, dass die konstitutive MMP-2-Synthese durch IFN (Interferon)- β und IFN- γ , nicht jedoch durch IFN- α vermindert werden kann. Blaschke et al. (Blaschke et al. 2003) fanden kürzlich heraus, dass RA-SFB nach Stimulierung mit dem in der RA-SM exprimierten Chemokin Fractalkine (CX3CL1) verstärkt MMP-2 synthetisieren.

Die schwache Regulierung der MMP-2-mRNA-Expression und die konstitutive Sekretion deuten darauf hin, dass die MMP-2 posttranslational reguliert wird (Goldbach-Mansky et al. 2000). ProMMP-2 kann extrazellulär durch Thrombin (Nguyen et al. 1999) oder die Serin-Protease APC (aktiviertes Protein C) aktiviert werden (Nguyen et al. 2000). Am bedeutendsten und am besten charakterisiert ist jedoch die Aktivierung von proMMP-2 über einen trimolekularen Komplex mit TIMP-2 (siehe 2.4.3) und MMP-14 (siehe 2.3.2) an der Zelloberfläche (Abb. 9). Dabei stellt MMP-14 eine Art Rezeptormolekül dar, an das der proMMP-2/TIMP-2-Komplex gebunden wird (Curry und Osteen 2003, Ellerbroek und Stack 1999). Eine benachbarte, TIMP-2-freie MMP-14 schneidet dann die proMMP-2 im Propeptid, wodurch eine intermediäre MMP-2-Form entsteht. Anschließend findet eine weitere Spaltung durch einen autolytischen Prozess bzw. durch Plasmin statt, was zur Freisetzung der nun prozessierten MMP-2 führt (Sounni et al. 2003).

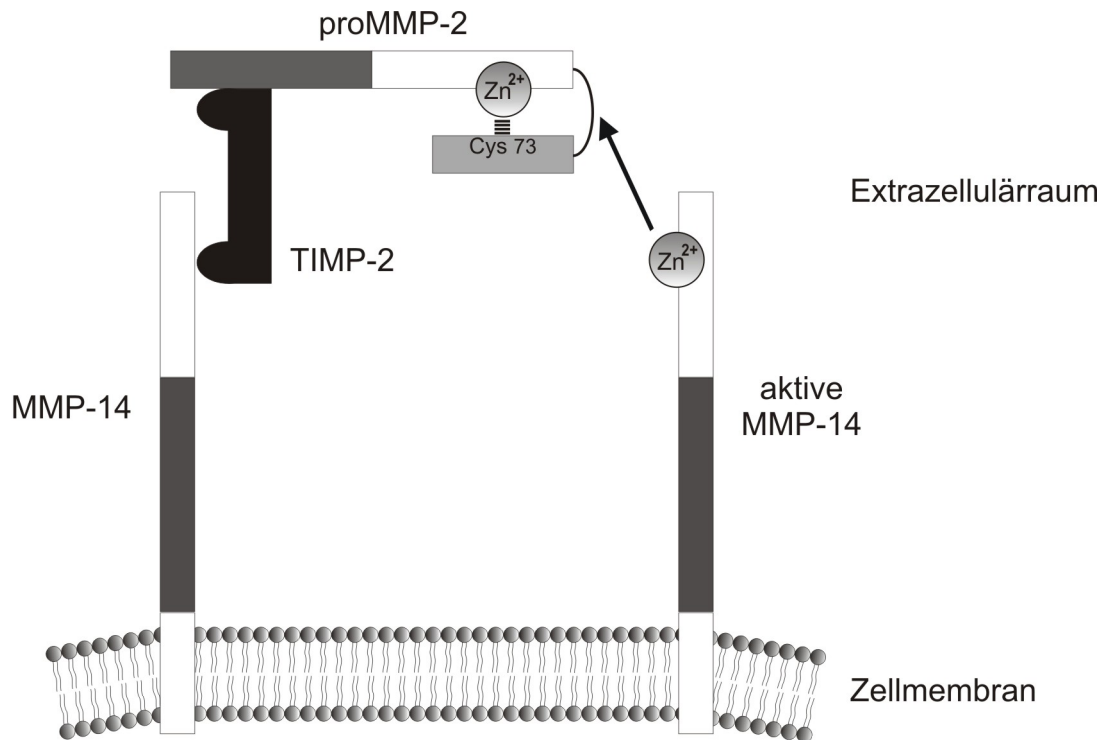


Abb. 9: Prozessierung von proMMP-2 an der Zelloberfläche

Schematisch dargestellt ist der membrangebundene proMMP-2-Aktivierungskomplex bestehend aus MMP-14, TIMP-2 und proMMP-2 (nach Ellerbroek und Stack 1999). Eine weitere TIMP-2-freie MMP-14 schneidet das Propeptid der proMMP-2 (Pfeil). Nach der darauf folgenden Spaltung wird die prozessierte MMP-2 freigesetzt (nicht dargestellt).

MMP = Matrixmetalloproteinase, TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; Zn = Zink; Cys = Cystein

Nach diesem Modell wird proMMP-2 bei einer im Vergleich zu MMP-14 niedrigeren Konzentration von TIMP-2 durch MMP-14 prozessiert und somit aktiviert. Dahingegen inhibiert eine höhere Konzentration von TIMP-2 vermehrt MMP-14, wodurch nicht genügend TIMP-2-freie MMP-14 für die Prozessierung von im Komplex gebundenen proMMP-2 vorliegen (Sounni et al. 2003). TIMP-2 und MMP-14 erweisen sich somit als wichtige Regulatoren für die Prozessierung der MMP-2. Dies wurde auch durch Untersuchungen an TIMP-2- bzw. MMP-14-defizienten Mäusen bestätigt (Wang et al. 2000, Zhou et al. 2000).

Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die MT-MMP MMP-15, MMP-16, MMP-24 und MMP-25 in der Lage sind, proMMP-2 zu aktivieren (Sounni et al. 2003), wobei TIMP lediglich bei der Aktivierung der proMMP-2 durch MMP-16 von Bedeutung sind. So zeigen neueste Untersuchungen, dass sowohl TIMP-2 als auch TIMP-3 die durch MMP-16 vermittelte Aktivierung von proMMP-2 unterstützen. Diese Aktivierungsmechanismen scheinen über ähnliche trimolekulare Komplexe wie den proMMP-2/TIMP-2/MMP-14-Komplex zu erfolgen, sind allerdings nicht so effizient (Zhao et al. 2003a). Morrison et al. (Morrison et al.

2001) berichteten dagegen, dass proMMP-2 durch MMP-15 über einen von TIMP-2 unabhängigen Pfad aktiviert werden kann.

Eine weitere Regulierungsmöglichkeit der MMP-2 besteht auf der Ebene seiner inaktiven Vorstufe, der proMMP-2. Hierbei ist Thrombospondin-2 in der Lage, einen Komplex mit proMMP-2 auszubilden. Durch die nachfolgende Rezeptor-vermittelte Endozytose dieses proMMP-2/Thrombospondin-2-Komplexes resultiert schließlich eine Verminderung der extrazellulären proMMP-2 (siehe Abb. 8, S. 33) (Yang et al. 2001). Die Aussagen zu Thrombospondin-1 sind widersprüchlich: so wurde einerseits berichtet, dass Thrombospondin-1 proMMP-2 bindet und deren Aktivierung dadurch indirekt hemmt (siehe Abb. 8) (Bein und Simons 2000); demgegenüber konnte aber auch eine durch Thrombospondin-1 gesteigerte Sekretion und Aktivierung von proMMP-2 beobachtet werden (Lee et al. 2003, Taraboletti et al. 2000). Unlängst ist in diesem Zusammenhang auch die Bedeutung der Familie der Testicane beschrieben worden. Testican-1 und Testican-3 inhibieren die Aktivierung von proMMP-2 über eine Inhibierung von MMP-14 oder MMP-16, wohingegen Testican-2 diese Inhibierung der MT-MMP aufhebt (Hausser und Brenner 2004).

Eine direkte Regulierung der MMP-2-Aktivität wird über die Inhibierung der prozessierten MMP-2 erreicht. Hierfür steht im Serum α_2 -Makroglobulin im Vordergrund. Dieses Molekül ist allerdings zu groß, um in die Gewebe zu gelangen. Dort hemmen primär die TIMP als endogene Inhibitoren der MMP u. a. auch die Aktivität der MMP-2 (Brew et al. 2000) (siehe 2.4, S. 38). Die größte Bedeutung in der Inhibierung der prozessierten MMP-2 kommt dabei TIMP-2 zu (Yoshizaki et al. 2002). Erwähnenswert sind an dieser Stelle die synthetisch hergestellten MMP-Inhibitoren (MMPI). Ihre Entwicklung führte von anfangs recht unspezifischen MMPI zu später sehr spezifischen MMPI. Ihren Einsatz erfuhren die MMPI bisher bevorzugt bei Untersuchungen an Tumorerkrankungen. Trotz der hohen Erwartungen und der Effizienz in Tiermodellen wurden die klinischen Studien mit MMPI der ersten Generation wegen unerwarteter Komplikationen abgebrochen (Borkakoti 2004), wie z. B. muskuloskeletale Schmerzen, Tendinitiden sowie gesteigertes Tumorwachstum mit verminderter Überlebenszeit. Interessanterweise wurden neben einem synthetischen Peptid (CTTHWGFTLC) zwei weitere Inhibitoren [4-(4-phenoxphenylsulfonyl)butane-1,2-dithiol und 5-(4-phenoxphenylsulfonyl)pentane-1,2-dithiol] beschrieben, die potent und selektiv Gelatinasen inhibieren (Koivunen et al. 1999, Rosenblum et al. 2003). Es fehlen bislang aber ausreichend klinische Studien, um über die Effizienz und Nebenwirkungen dieser Inhibitoren weitergehende Aussagen treffen zu können.

2.3.4.3 Detektionsmöglichkeiten der MMP-2

Aufgrund ihrer beträchtlichen Bedeutung bei der RA sowie bei Tumorerkrankungen und weiteren Prozessen wurde für die MMP-2 eine Vielzahl von Detektionsmöglichkeiten entwickelt. Für die Quantifizierung der MMP-2-RNA stehen die konventionelle PCR (*polymerase chain reaction*) (Tsuboi et al. 2003) und die Realtime-PCR (Jo et al. 2004) zur Verfügung. Beide Verfahren basieren auf der Amplifizierung der Ausgangs-cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) mittels DNA-Polymerase und Oligonukleotidprimer. Das resultierende Produkt der konventionellen PCR wird mit einem interkalierenden Farbstoff (z. B. Ethidiumbromid) auf ein Agarosegel aufgetragen, wodurch es nach der elektrophoretischen Auftrennung im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. In der Realtime-PCR wird ein fluoreszierender Farbstoff in die DNA eingebaut, welcher zur Quantifizierung des DNA-Produkts genutzt wird. Die Northern-Blot-Methode dient der Detektion spezifischer RNA. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel wird die RNA auf einem Nitrozellulosefilter fixiert und anschließend mit einer komplementären, markierten RNA-Sonde detektiert. Die Identifikation des MMP-2-Proteins kann unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels Western-Blot (Duszyk et al. 1999) oder Immunopräzipitation (Yorioka et al. 2002) erfolgen. Bei der Western-Blot-Methode erfolgt zunächst die elektrophoretische Auftrennung der Probe. Danach werden die auf dem Gel separierten Proteine auf einem Nitrozellulosefilter fixiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Immunopräzipitation ist eine Methode zur Isolation von Antigenen aus einem Zelllysats mittels im Überschuss eingesetzter spezifischer Antikörper. Auch der Nachweis eines Proteins ist so möglich.

Quantitative Analysen der Konzentration des MMP-2-Proteins im Serum oder in Zellkulturüberständen können auch mittels ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) durchgeführt werden (Smith 2003). Hierbei bindet ein primärer, festphasengekoppelter spezifischer Antikörper an das Protein. Im nächsten Schritt bindet ein sekundärer, markierter Antikörper an den primären Antikörper. Mithilfe des markierten Antikörpers erfolgt die quantitative Erfassung des MMP-2-Proteins.

Aussagen über die Aktivität der proMMP-2 und der prozessierten MMP-2 können anhand eines spezifischen Aktivitäts-Assays (Capper et al. 1999) und der Zymographie (Hawkes et al. 2001) erhoben werden. Im Aktivitäts-Assay wird das Protein an einen festphasengekoppelten spezifischen Antikörper gebunden und aktiviert im Anschluss ein zugegebenes Enzym. Dieses aktivierte Enzym setzt ein zugegebenes Substrat um, welches der Quantifizierung der spezifischen MMP-2-Aktivität dient. Nach der Zugabe von APMA (*p-aminophenylmercuric*

acetate), welches die an den spezifischen Antikörper gebundene proMMP-2 aktiviert, kann im Aktivitäts-Assay auch proMMP-2 erfasst werden (Details siehe 4.6.1, S. 55). Die Gelatine-Zymographie bedient sich der Gelatine-degradierenden Eigenschaft der MMP-2. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Gelatinegel degradiert die MMP-2 die angrenzende Gelatine. Mittels Färbetechniken werden die im Gel degradierten Areale durch ihre geringere Anfärbbarkeit densitometrisch quantifizierbar. Auch in der Zymographie wird die ursprünglich inaktive proMMP-2 detektiert, weil sie während der Auftrennung in einem SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamidgel aktiviert wird und somit gelatinolytisch wirkt (Details siehe 4.6.2, S. 56).

In der histologischen Detektion von MMP-2-Protein finden die Immunhistochemie (Lhotak et al. 2000) und Mikrodisektion (Emmert et al. 1994) Anwendung. In der Immunhistochemie werden Schnittpräparate paraffineingebetteter Gewebe verwendet. Primäre, spezifische Antikörper binden an MMP-2-Antigene. Sekundäre, markierte Antikörper dienen der Visualisierung. Das System für die Mikrodisektion besteht aus einem Mikroskop mit eingekoppeltem Laser, der an eine digitale Videokamera und einen Computer angeschlossen ist. Über eine Software werden die Zellen im Schnittpräparat markiert und der Laser gesteuert. Der Laser kann im Gewebeschnitt zum Schneiden und Katapultieren der Zellen eingesetzt werden. Die Zellen gelangen so in ein Reaktionsgefäß und können dann weiter analysiert werden. Die Mikrodisektion bietet somit die Möglichkeit, definierte Regionen oder Zellen aus unterschiedlichen Geweben zu isolieren.

2.4 Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)

2.4.1 Bedeutung der TIMP

Eine exakte Kontrolle der MMP-Aktivität ist für regulierte Umbauvorgänge der EZM notwendig, um einen exzessiven Abbau der EZM durch MMP zu vermeiden. Einerseits kann dies durch Zytokine mittels positiver oder negativer Regulatoren auf der Ebene der MMP-mRNA-Expression erfolgen. Zum anderen spielen posttranslational die proteolytische Aktivierung der MMP-Zymogene und die Inhibierung der prozessierten MMP eine entscheidende Rolle (Ries und Petrides 1995). Während die MMP im Serum maßgeblich durch α_2 -Makroglobulin inhibiert werden, wird diese Aufgabe im Gewebe vornehmlich von den TIMP eingenommen (Brew et al. 2000).

Der erste TIMP (TIMP-1) wurde erstmals im Jahr 1979 von Welgus et al. (Welgus et al. 1979) isoliert, damals noch unter dem Namen „Fibroblasten anti-Kollagenase“. Nachdem das Protein 1985 kloniert worden war (Docherty et al. 1985), stellte sich durch Sequenzvergleich heraus, dass es sich bei TIMP-1 und dem Faktor mit *erythroid potentiating activity* (EPA) um das identische Molekül handelt (Gasson et al. 1985). Inzwischen sind beim Menschen vier TIMP bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert worden sind (Fassina et al. 2000).

2.4.2 Struktur und Funktion der TIMP

Unter den vier TIMP besteht auf Aminosäureebene ein bemerkenswertes Maß an Homologie (Nagase und Brew 2002). Hinsichtlich ihrer Struktur lassen sich die TIMP in zwei Domänen unterteilen, eine N-terminale Domäne aus ca. 125 Aminosäuren und eine C-terminale Domäne aus ca. 65 Aminosäuren. Jede der beiden Domänen enthält sechs konservierte Cysteinmoleküle, welche die Domänen über jeweils drei Disulfidbrücken stabilisieren. Hierdurch ergeben sich die für die TIMP charakteristischen sechs Schleifen. Die TIMP erhalten damit eine keilförmige Struktur, wodurch sie ähnlich wie ein Substrat in das aktive Zentrum der MMP passen. Die N-terminale Domäne faltet sich als separater Bereich und vermittelt über vier Cysteinmoleküle und die ihnen benachbarte C-Verbindungsschleife die Inhibierung der MMP. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Cysteinmolekül 1 zu. Es bindet nach der Verdrängung des Wassermoleküls an das katalytische Zink im aktiven Zentrum der MMP und trägt durch diese Wechselwirkung wesentlich zur Inhibierung der MMP bei (Visse und Nagase 2003). Weiterhin liegt in der N-terminalen Domäne die TIMP-Konsensussequenz VIRAK (ValIleArgAlaLys), deren genaue Funktion nach wie vor unbekannt ist (Greene et al. 1996). Die C-terminale Domäne dient der Anlagerung der TIMP an die MMP. Bei dieser Interaktion nimmt die Hämoexindomäne der MMP eine wichtige Rolle ein (Nagase und Brew 2002).

Die wichtigste Funktion der TIMP ist die Inhibierung der MMP, die in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 erfolgt. Zwar können alle TIMP jede bisher getestete MMP inhibieren - mit Ausnahme von TIMP-1, welcher MMP-14 nicht inhibiert -, jedoch bestehen Spezifitäten einzelner TIMP für bestimmte MMP (Visse und Nagase 2003). So bindet TIMP-2 mit hoher Affinität an MMP-2, wohingegen TIMP-3 nur schwach an MMP-3 bindet (Nagase und Brew

2002). Weiterhin wurde durch Untersuchungen am MMP-3/TIMP-1-Komplex gezeigt, dass das Threonin an Position 2 des TIMP-Moleküls sowohl auf die Stabilität des Komplexes als auch auf die Spezifität für bestimmte MMP einen großen Einfluss hat (Meng et al. 1999).

Neben deren Funktion als endogene Inhibitoren der MMP sind die TIMP als multifunktionelle Proteine an weiteren Vorgängen wie der Aktivierung von MMP-Zymogenen, dem Zellwachstum, der Inhibierung der Angiogenese und der Regulierung der Apoptose beteiligt (Fassina et al. 2000).

2.4.3 Mitglieder der TIMP-Familie

TIMP-1 ist ein lösliches, glykosyliertes Protein von 28 kDa (Fassina et al. 2000). Neben der Inhibierung von MMP beeinflusst TIMP-1 auch das Wachstum von Zellen (Hayakawa et al. 1992) und die Differenzierung von Erythrozyten-Vorläufern (Gasson et al. 1985) und B-Zellen (Guedez et al. 1998). Weiterhin unterdrückt TIMP-1 die Apoptose vieler Zelllinien (Fassina et al. 2000), möglicherweise basierend auf seiner Lokalisation im Zellkern von Fibroblasten (Zhao et al. 1998).

Anders als TIMP-1 ist TIMP-2 ein lösliches, nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. TIMP-2 ist insofern bemerkenswert, als er einerseits maßgeblich an der Aktivierung von proMMP-2 beteiligt ist (Fassina et al. 2000) (siehe 2.3.4.2), andererseits aber neben der proMMP-2 auch die prozessierte MMP-2 inhibiert. Wie auch TIMP-1 inhibiert TIMP-2 die Tumorerkrankung und Metastasierung (Albini et al. 1991), kann die Proliferation von Zellen fördern (Hayakawa et al. 1994) und hat eine anti-apoptotische Wirkung auf eine Reihe von Zellen (Fassina et al. 2000).

TIMP-3 ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa. Dabei handelt es sich im Gegensatz zu den anderen drei TIMP nicht um ein lösliches, sondern um ein an die EZM gebundenes Protein. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-3 neben MMP auch Mitglieder der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie hemmt, so z. B. das *TNF- α converting enzyme* TACE (ADAM-17) (Nagase und Brew 2002). TIMP-3 supprimiert das Wachstum primärer Tumoren (Bachman et al. 1999). Durch TIMP-3 wird - im Gegensatz zu TIMP-1 und TIMP-2 - Apoptose induziert (Smith et al. 1997). Die Expression von TIMP-3 wird durch PDGF induziert (Fassina et al. 2000).

Weiterhin wird durch TNF- α , TGF- β und TPA die Gen-Expression von TIMP-1 und TIMP-3 gesteigert, von TIMP-2 dagegen vermindert (Fassina et al. 2000). Dies deutet auf eine von den anderen TIMP unabhängige Regulation der TIMP-2 hin.

Das jüngste Mitglied der TIMP-Familie ist der 1996 von Greene et al. (Greene et al. 1996) beschriebene TIMP-4. Er ist ein lösliches, nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. TIMP-4 zeigt gegenüber dem konstitutiv und ubiquitär exprimierten TIMP-2 eine sehr gewebsspezifische Expression, insbesondere im Herzgewebe (Greene et al. 1996). TIMP-4 wurde als äußerst potenter Inhibitor der MMP-14/TIMP-2-vermittelten Aktivierung von proMMP-2 beschrieben (Bigg et al. 2001). TIMP-4 inhibiert auch effizient MMP-14, MMP-15 und MMP-16, ist aber nicht in der Lage, mit diesen einen trimolekularen Komplex auszubilden und über diesen Weg proMMP-2 zu aktivieren (Zhao et al. 2003a).

2.4.4 TIMP in der RA

Bereits 1981 berichteten Murphy et al. (Murphy et al. 1981), dass Synovialmembrankulturen TIMP-1 produzieren. Mercer et al. (Mercer et al. 1985) reinigten vier Jahre später TIMP-1 aus RA-SF. Der Zusammenhang zwischen TIMP-1 und dessen Einfluss auf die Knochen- und Knorpeldestruktion wurde 1989 erkannt und beschrieben. Diese Annahme gründete auf der Beobachtung, dass die systemische Applikation von TIMP-1 die Knorpeldestruktion in der Kollagen-induzierten Arthritis bei der Maus verringert (Carmichael et al. 1989). Paradoxe Ergebnisse hierzu lieferten später Apparailly et al. (Apparailly et al. 2001), die durch die Überexpression von TIMP-1 in der Kollagen-induzierten Arthritis bei der Maus keinen Schutz vor Knorpeldestruktion zeigen konnten. Im Jahr 1990 wurde TIMP-1 immunhistologisch in der hyperplastischen Deckzellschicht der RA-SM nachgewiesen (Okada et al. 1990) und dessen Expression in RA-SFB untersucht (MacNaul et al. 1990). Inzwischen existiert eine Vielzahl von Publikationen, welche die TIMP-Expression in der RA durch SFB beleuchten, wobei der Schwerpunkt auf TIMP-1 liegt.

Die Expression von TIMP-1 (Hembry et al. 1995, Nawrocki et al. 1994), TIMP-2 (Nawrocki et al. 1994) und TIMP-3 (Takizawa et al. 2000) konnte in immunhistologischen Untersuchungen in der hyperplastischen Deckzellschicht der SM nachgewiesen werden. Allerdings sind die Ergebnisse über die Expression von TIMP-2 in der SM sehr widersprüchlich (Hembry et al. 1995, Kontinen et al. 1998, Nawrocki et al. 1994).

3. ZIELE DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Expressions-, Proteinkonzentrations- und Aktivitätsprofil von MMP-2 in Zytokin-stimulierten GT-SFB und RA-SFB bzw. deren Überständen zu charakterisieren. Erstmalig erfolgte somit eine vergleichende Betrachtung unter Verwendung kurz-passagierter SFB, die unter gängigen Kulturbedingungen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α sowie dem Wachstumsfaktor PDGF-BB stimuliert wurden. Die Untersuchungen umfassten dabei Analysen der MMP-2-mRNA-Expression in den Zellextrakten der GT- und RA-SFB sowie der Proteinsynthese und proteolytischen Aktivität von MMP-2 in den Zellkulturüberständen der GT- und RA-SFB. Ferner wurde die Aktivität der TIMP sowie mehrerer MMP (im Folgenden „Total-MMP-Aktivität“ genannt; Details siehe 4.6.3) unter gängigen Kulturbedingungen und nach Stimulierung mit den o. g. Zytokinen in den Zellkulturüberständen von GT- und RA-SFB untersucht.

In vivo ist von den MMP-2-Formen in der SM (siehe Abb. 5, S. 30) lediglich die freie prozessierte MMP-2 proteolytisch aktiv. In diesem Zusammenhang ist in der SM auch ein Einfluss veränderter Mengen an TIMP (insbesondere TIMP-2) auf die Aktivität der MMP-2 zu vermuten (Zhao et al. 2003a), zumal in der RA eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen MMP und TIMP beschrieben wurde (Goldbach-Mansky et al. 2000). *In vitro* hingegen besteht die Möglichkeit, auch die potenzielle Aktivität der TIMP-gebundenen MMP-2-Formen sowie der proMMP-2 zu erfassen.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 10) veranschaulicht das komplexe Netzwerk von TIMP-gebundener und freier proMMP-2 bzw. prozessierter MMP-2. Außerdem wird darin auf die eingesetzten Methoden und die jeweils detektierten MMP-2-Formen verwiesen.

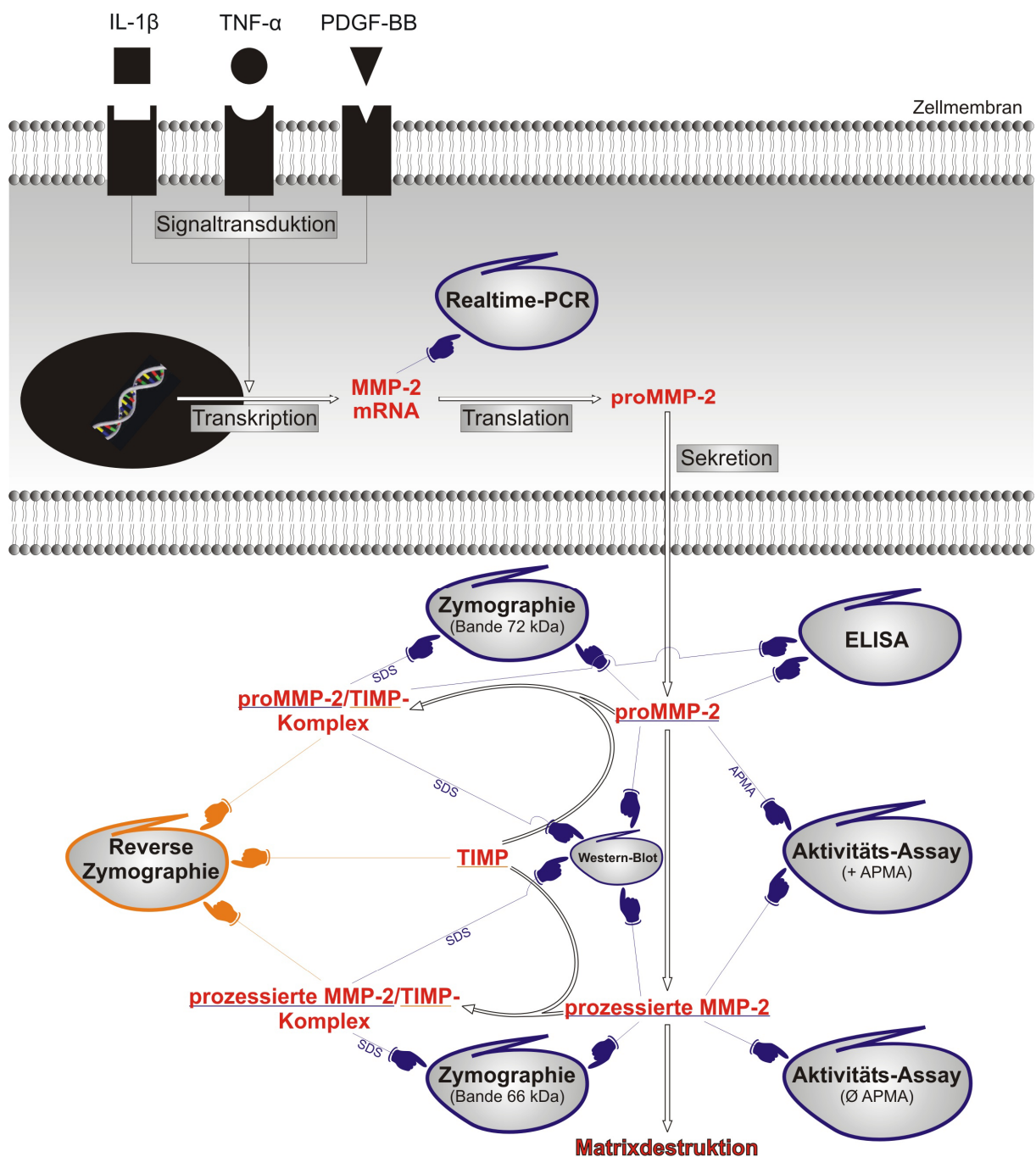


Abb. 10: Arbeitskonzept der Untersuchung

Dargestellt ist der Syntheseweg der MMP-2 bis zu ihrer gewebsdestruktiven Wirkung. Blau eingerahmt sind die auf den verschiedenen Ebenen eingesetzten Methoden zur Detektion der MMP-2 mit Verweis auf die erfassten Messgrößen; orange eingerahmt ist die Reverse Zymographie zur Detektion von TIMP. Der ebenso eingesetzte unspezifische Aktivitäts-Assay ist nicht dargestellt.

Die exemplarischen Hinweise auf die SDS-Verwendung in den Gelen der Zymographien und des Western-Blots verdeutlichen, dass die TIMP-gebundenen MMP-2-Formen ebenso detektiert werden wie die freien MMP-2-Formen (Details siehe 4.6.2). Im spezifischen Aktivitäts-Assay ermöglicht die Verwendung von APMA (neben der Detektion der freien prozessierten MMP-2) zusätzlich die Detektion der freien proMMP-2 (Details siehe 4.6.1).

Fortsetzung der Beschreibung von Abb. 10:

IL-1 β = Interleukin-1 β ; TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α , PDGF-BB = platelet-derived growth factor-BB; PCR = polymerase chain reaction; MMP = Matrixmetalloproteinase; mRNA = messenger ribonucleic acid; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; ELISA = enzyme-linked immuno sorbent assay; SDS = sodium dodecyl sulfate; APMA = p-aminophenylmercuric acetate

Grundlage dieser Arbeit waren die unter gängigen Kulturbedingungen unstimulierten bzw. mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB stimulierten SFB bzw. deren Überstände. Hierauf basierend sollten Aussagen getroffen werden über

- die mRNA-Expression, Proteinkonzentration und Aktivität der MMP-2 von stimulierten GT- und RA-SFB,
- die Total-MMP-Aktivität von stimulierten GT- und RA-SFB,
- den Vergleich der Methoden spezifischer Aktivitäts-Assay und Zymographie zur Bestimmung der MMP-2-Aktivität von stimulierten GT- und RA-SFB.

Die Ergebnisse bei RA-SFB wurden wegen des Verständnisses und der Vollständigkeit in den Kontext dieser Arbeit aufgenommen und diskutiert. An dieser Stelle wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die entsprechenden Laborarbeiten mit den RA-SFB - mit Ausnahme der Zymographien - dankenswerterweise von Frau Dr. E. Kunisch durchgeführt wurden.

4. METHODIK

4.1 Patienten

GT-Synovialgewebe wurde bei operativen Eingriffen von Patienten in der Chirurgischen Klinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU Jena, Deutschland) entnommen, und Synovialgewebe von Patienten mit der klinischen Diagnose RA wurde bei Gelenkersatzoperationen in der Klinik für Orthopädie (Eisenberg, Deutschland) der FSU Jena gewonnen. Die *American Rheumatism Association* ARA (jetzt: *American College of Rheumatology*, ACR) entwickelte und überarbeitete für die Klassifikation der aktiven RA weithin anerkannte Kriterien, die klinische, serologische und radiologische Merkmale beinhalten (Arnett et al. 1988). Alle RA-Patienten erfüllten die ARA-Kriterien für die RA (Tab. 3). Die Ethikkommission der FSU Jena genehmigte sämtliche Studien (Aktenzeichen 0256-5/99).

Tab. 3: Klinische Charakterisierung der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Patient	Geschlecht/ Alter (Jahre)	Erkrankungs- dauer	RF	BSG (mm/1 h)	CRP (mg/l)	# der ARA- Kriterien	Medikamente
Gelenktrauma (GT)							
EB72	w/18	2 Jahre	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
J6	m/17	12 Tage	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
J7	m/39	27 Tage	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
J10	m/49	2 Tage	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
J12	m/36	2 Tage	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
J13	w/16	5 Tage	n. b.	n. b.	n. b.	0	keine
Rheumatoide Arthritis (RA)							
EB35	w/66	25 Jahre	+	62	53.4	7	NSAIDs, MTX, Sulfas., Steroide
EB40	w/64	24 Jahre	+	18	2.9	4	NSAIDs, Steroide, Azathioprin
EB41	w/63	17 Jahre	+	34	8.2	4	NSAIDs, Sulfas., Steroide
EB42	w/71	44 Jahre	+	50	35.8	4	NSAIDs, Steroide
EB50	w/46	1 Jahr	+	16	5.5	4	NSAIDs, MTX
EB52	m/76	5 Jahre	+	45	38.5	6	NSAIDs

w = weiblich; m = männlich; - = negativ; + = positiv; RF = Rheumafaktor; n. b. = nicht bestimmt; BSG = Blutkörperchengeschwindigkeit (Referenzbereich: w < 15 mm/1 h; m < 10 mm/1 h); CRP = C-reaktives Protein (Referenzbereich: < 5 mg/l); ARA = American Rheumatism Association; MTX = Methotrexat; NSAID = nonsteroidal anti-inflammatory drug; Prednis. = Prednisolon; Sulfas. = Sulfasalazin

Das Synovialgewebe wurde nach Entnahme in Kulturmedium überführt [DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*)/12.5 mM HEPES (Hydroxyethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure), Gentamicin (100 µg/ml), 10% FKS (fötales Kälberserum); alles Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland].

4.2 In vitro Kultur von SFB aus GT- und RA-Patienten

4.2.1 Isolierung von Zellen aus der Synovialmembran

Die Isolierung der Zellen erfolgte innerhalb einer Stunde nach Entnahme des Gewebes. Hierfür wurde das Synovialgewebe in einer 0.1% Trypsin (Invitrogen)/Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung [PBS (*phosphate-buffered saline*); 137 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 8.1 mM Na₂HPO₄; 1.76 mM KH₂PO₄ (alles Roth, Karlsruhe, Deutschland)] mechanisch zerkleinert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Gewebestücke wurden anschließend in eine 0.1% Kollagenase P (Roche, Mannheim, Deutschland)/DMEM/10% FKS-Lösung überführt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte die Filtration der Zellsuspension durch ein steriles Sieb (50 µm Poren; Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Danach wurden die Zellen für 10 min bei 280 g abzentrifugiert (Centrifuge 5415 D; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium [DMEM/12.5 mM HEPES, Gentamicin (100 µg/ml), 10% FKS; alles Invitrogen] aufgenommen und in Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden einen Tag und drei Tage nach Beginn der Kultur durch Abnahme des Kulturüberstandes entfernt (Hirth et al. 2002, Zimmermann et al. 2001).

4.2.2 Reinigung der synovialen Zellen mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads

Nach 7 Tagen Kultur wurde ein Reinigungsschritt zur Trennung von SFB und Makrophagen mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads durchgeführt (Zimmermann et al. 2001). Die an der Kulturflasche adhärenenten synovialen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 0.25% Trypsin, in Versene verdünnt (beides Invitrogen), auf die Zellen dünn verteilt, und die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in

Kulturmedium/10% FKS suspendiert und für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Für die Trennung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml PBS/2% FKS suspendiert und mit der 4-fachen Anzahl von anti-CD14-mAk-gekoppelten Dynabeads[®] M-450 CD14 (Klon RNO 52; Dynal, Hamburg, Deutschland) für 1 h bei 4°C inkubiert.

Mithilfe des Dynal-MPC[®] (*magnetic particle concentration*; Dynal) erfolgte die Abtrennung der CD14-positiven Zellen. Der Überstand wurde abgenommen und gesammelt. Die Zellen aus dem Überstand wurden zentrifugiert und zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Die Zellzahl wurde mittels Zählung in der Neubauer-Kammer ermittelt. Es folgte die weitere Kultur der negativ gereinigten GT- bzw. RA-SFB bis zur 3. bzw. 2. Passage.

4.2.3 Stimulierung der GT- und RA-SFB mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB

Für die Untersuchung des Einflusses von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB auf GT- und RA-SFB wurden Zellen am Anfang der 3. Passage bzw. am Anfang der 2. Passage verwendet. Zellen direkt aus der Primärkultur wurden nicht verwendet, da in der Regel keine ausreichend hohe Zellzahl erzielt werden konnte.

Für die Stimulierung wurden 2×10^5 Zellen je Loch in eine 6-Lochplatte (BD Biosciences Labware, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und für 24 h bei 37°C in Kulturmedium/10% FKS inkubiert. Danach wurde zur Reduzierung des Serumeinflusses Kulturmedium mit 1% FKS für 72 h auf die Zellen gegeben. Es folgte die Stimulierung der Zellen für 24 h bei 37°C in Kulturmedium/1% FKS mit IL-1 β [10; 50; 100 U/ml (Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland)], TNF- α [1.0; 10.0; 25.0 ng/ml (Chemicon, Hofheim, Deutschland)] oder PDGF-BB [2.5; 5.0; 10.0 U/ml (R+D System, Wiesbaden, Deutschland)].

4.3 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie

4.3.1 Detektion von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Reinheit der für die Versuche verwendeten GT- und RA-SFB wurde dankenswerterweise von Frau Dr. E. Kunisch durchgeführt.

Um die Reinheit der mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads negativ isolierten SFB zu bestimmen, wurden Zellen der GT-Patienten nach der 1. Passage bzw. Zellen der RA-Patienten unmittelbar nach der Reinigung durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Detektion von Oberflächenproteinen wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 4°C mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper inkubiert (Tab. 4). Die Zellen wurden danach mit einem FITC (Fluoresceinthiocyanat)-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 3 min bei 290 g dreimal mit FACS (*fluorescence activated cell sorter*)-PBS (PBS/1% FKS) gewaschen. Für die Detektion von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen für 10 min bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd (Fluka, Steinheim, Deutschland)/PBS fixiert. Um intrazellulär lokalisierte Proteine zugänglich zu machen, folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit Permeabilisierungspuffer [PE-Puffer; PBS/1% FKS/0.5% Saponin (Serva, Heidelberg Deutschland)]. Die Verdünnung der Antikörper und die anschließenden Waschschrte erfolgten in PE-Puffer. Die Zellen wurden für 45 min bei 4°C mit dem jeweiligen spezifischen, primären Antikörper inkubiert. In Anschluss daran erfolgte die Detektion des primären Antikörpers mittels eines sekundären, FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörpers (45 min bei 4°C, Dako). Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren in FACS-PBS überführt.

Tab. 4: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper

Antikörper (Klon)	erkanntes Antigen	zelluläre Lokalisation	zelluläre Expression	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
IgG ₁	Isotyp-Kontrolle			10	Dako
AS02	CD90	Membran	Fibroblasten, Endothelzellen, Thymozyten	10	Dianova
TÜK4	CD14	Membran	Monozyten/Makrophagen	10	Dako
TM316	CD11b	Membran	Monozyten/Makrophagen, PMN, NK-Zellen	10	Dianova
3-2B12	Prolyl-4-Hydroxylase	Zytoplasma	Fibroblasten, Endothelzellen	10	Dianova

IgG = Immunglobulin G; CD = cluster of differentiation; PMN = polymorphkernige neutrophile Leukozyten; NK-Zellen = natürliche Killerzellen

4.3.2 Analyse und Auswertung

Nach der Färbung wurden die Zellen mit einem FACSCalibur[®] analysiert (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Dabei wurden während der Messung 10 000 Zellen erfasst. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Cell Quest[®] (Becton Dickinson). „Forward“ und „side scatter gates“ wurden so gesetzt, dass alle lebenden Zellen erfasst wurden. Durch die Autofluoreszenz der Zellen und die unspezifische Immunglobulin-Bindung wird in der Durchflusszytometrie eine Hintergrundfärbung hervorgerufen. Um diese zu berücksichtigen, wurde in der Färbung mit der jeweiligen Isotyp-Kontrolle ein „Gate“ gesetzt. Dabei wurden ca. 99% der positiven Zellen bei Einsatz der Isotyp-Kontrolle ausgeschlossen.

4.4 Bestimmung der MMP-2-Expression in stimulierten GT- und RA-SFB

4.4.1 Isolierung der RNA aus GT- und RA-SFB

Die RNA von 2×10^5 Zellen wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (NucleoSpin[®] RNA; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Hierfür wurden zunächst die Überstände der stimulierten Zellen abgenommen und für weitere Analysen gesammelt. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit PBS gewaschen und anschließend direkt in der Platte mit 400 µl Lysispuffer (RA1) lysiert. Das Lysat wurde in ein 1500-µl-Reaktionsgefäß überführt, mit 4 µl Mercaptoethanol (Roth) versetzt und gut gemischt. Im Anschluss wurden 300 µl von 98%-igem Ethanol (Roth) hinzugegeben, gut gemischt und die Lösung auf eine NucleoSpin[®]-Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 g für 30 sec. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl MDB (*membrane desalting buffer*) auf die Säule gegeben. Daraufhin wurde bei 1000 g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss abermals verworfen. Zur Eliminierung von DNA in den Proben folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt mit 95 µl DNase-Reaktionslösung (90% DNase-Reaktionspuffer, 10% DNase-Stammlösung). Im Anschluss wurden 200 µl DNase-Inaktivierungspuffer (RA2) hinzugegeben und die Säule bei 800 g für 30 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurde die Säule zweimal mit dem Puffer RA3 gewaschen (600 µl RA3 bei 800 g für 30 sec; 250 µl RA3 bei 1000 g für 2 min). Die RNA wurde mit 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C für maximal 4 Wochen gelagert.

4.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Superscript II reverser Transkriptase™ (Invitrogen). Es wurden von jeder Probe 20 µl cDNA synthetisiert. Hierfür wurden je Probe 11 µl RNA mit 1 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml; Dr. E. Birch-Hirschfeld, Institut für Virologie, FSU Jena) vermischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis und Zentrifugieren wurden zuerst 4 µl 5× „First Strand Puffer“, dann 2 µl 0.1 M DTT (1,4-Dithiothreitol; beides Invitrogen) und schließlich 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Dideoxynukleosidtriphosphat-Mix; Roche) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 min bei 42°C vorgewärmt, 1 µl Superscript II zugegeben und gemischt. Die cDNA-Synthese wurde anschließend für 50 min bei 42°C durchgeführt, und das Enzym danach durch eine 15-minütige Erhitzung auf 70°C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

4.4.3 Realtime-PCR

Die RNA-Expression der MMP-2 unter dem Einfluss von IL-1β, TNF-α oder PDGF-BB wurde durch die Realtime-PCR ermittelt. Hierfür wurde die cDNA-Menge jeder einzelnen Probe mittels einer initialen Realtime-PCR für das Housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase; sense: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGG-3', anti-sense: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTG-3') abgeglichen (Huber et al. 2003). Die mRNA-Expression von GAPDH wird durch die Stimulierung mit Zytokinen nicht beeinflusst (Qin et al. 1998). Für die Realtime-PCR des MMP-2-Gens wurden die bei Giambernardi et al. (Giambernardi et al. 1998) angegebenen Primer (sense: 5'-GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA-3', anti-sense: 5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGG-3') eingesetzt, die dankenswerterweise von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld synthetisiert wurden. Es wurden 40 Zyklen je PCR durchlaufen.

Die Quantifizierung der DNA-Menge nach jedem Zyklus erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I (Roche), der sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA einlagert. Durch diese Einlagerung kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der zur vorhandenen DNA-Menge direkt proportional ist und gemessen werden kann.

Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde durch initiale Sequenzierung des PCR-Produktes nach der Etablierung der Bedingungen überprüft.

4.4.3.1 Realtime-PCR-Bedingungen

Für die Realtime-PCR wurde zunächst ein Mastermix für 12 Proben hergestellt. Dieser bestand aus 165.6 µl sterilem H₂O, 14.4 µl 25 mM MCl₂, 24 µl „Hot Start Reaktionsmix“ [FastStart™ Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP Mix (mit dUTP anstatt dTTP), SYBR Green I, 10 mM MgCl₂; alles Roche] und jeweils 12 µl der genspezifischen Primer (10 µM). Jeweils 19 µl dieses Mastermix' wurden in die benötigte Anzahl von Realtime-PCR-Kapillaren (Roche) pipettiert. Das jeweils über den GAPDH-Abgleich bestimmte cDNA-Volumen (maximal 2.0 µl) wurde direkt hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde bei 3000 g für 30 sec in die Kapillaren zentrifugiert. Die PCR-Reaktionen fanden unter folgenden Bedingungen in einem LightCycler® System (Roche) statt:

	MMP-2		GAPDH	
• Initiale Denaturierung	95°C	10 min	95°C	5 min
Zyklen				
• Denaturierung	95°C	10 sec	95°C	5 sec
• Anlagerung der Primer	58°C	10 sec	53°C	10 sec
• Elongation	72°C	35 sec	72°C	20 sec
• Fluoreszenz-Messung (bei 530 nm)	78°C	5 sec	86°C	5 sec
Schmelzkurve				
• Denaturierung	95°C	5 sec	95°C	0 sec
• Beginn Schmelzkurve	68°C	10 sec	58°C	15 sec
• Temperaturerhöhung	0.1°C / sec		0.1°C / sec	
• Ende Schmelzkurve	95°C	0 sec	90°C	0 sec
• Kühlung	40°C	5 min	40°C	5 min

4.4.3.2 Auswertung

Die Auswertung der Realtime-PCR erfolgte unter Verwendung der LightCycler Software 3 (Roche).

Wie auch bei anderen Realtime-PCR-Systemen erfolgt die Quantifizierung durch die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, des so genannten Threshold Cycle oder C_T-Wertes. Der C_T-Wert ist als jener PCR-Zyklus definiert, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. So werden die C_T-Werte in einem Bereich der Kur-

ven ermittelt, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft. Zu diesem Zeitpunkt bestehen keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, abnehmende Enzymaktivität oder Inhibierung der PCR-Reaktion durch das Entstehen von Reaktionsprodukten. Anhand eines parallel amplifizierten Standards, dessen Standardkurve ermittelt wurde und dessen Templatmenge bekannt ist, wird die cDNA-Menge in den Kapillaren anhand der Fluoreszenz berechnet.

Die Fluoreszenz des MMP-2-PCR-Produktes wurde mit dem des entsprechenden GAPDH-PCR-Produktes abgeglichen, und das Ergebnis als \times -fache Expression der cDNA von SFB im Vergleich zur GAPDH dargestellt:

$$\text{x-fache Expression im Vergleich zur GAPDH} = \frac{\text{Expression MMP-2}}{\text{Expression GAPDH}}$$

Anschließend wurde die Fluoreszenz nach Stimulierung der Zellen mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB als prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS ausgedrückt. Dafür wurde die bei Alvares et al. (Alvares et al. 1995) angegebene Formel in modifizierter Form verwendet:

$$\text{prozentuale Induktion im Vergleich zu 1\% FKS} = \frac{\text{Expression MMP-2} \times 100 / \text{Expression GAPDH}}{\text{Expression MMP-2, 1\% FKS} / \text{Expression GAPDH, 1\% FKS}}$$

4.5 Bestimmung des MMP-2-Proteins in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB

4.5.1 Spezifische MMP-2-Detektion mittels Western-Blots

Zunächst wurde das Vorhandensein von MMP-2-Protein in den Überständen der stimulierten GT-SFB qualitativ mittels Western-Blot nachgewiesen. Dabei wurden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran überführt. Bei nachfolgender Immunodetektion mittels eines spezifischen Antikörpers wurde MMP-2 über Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Hierfür wurde das Trenngel (10%, 0.375 M Tris, pH 8.8) in einer Dicke von 1.5 mm in eine Minigel-Apparatur (Mini-PROTEAN 2; BioRad, München, Deutschland) gegossen. Nach

Auspolymerisation wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (4%, 0.125 M Tris, pH 6.8) überlagert.

Nach dessen Auspolymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer [0.025 M Tris; 0.192 M Glycin; 0.1% (w/v) SDS; pH 8.3; alles Roth] gefüllt. Die Proben wurden mit 5×Probenpuffer (0.625 M Tris-HCl, 12.5% Mercaptoethanol, 25% Glycerol, 0.3% Bromphenolblau, 5% SDS; pH 6.8; alles Roth) im Verhältnis 5 : 1 verdünnt und nachfolgend in einem Heizblock (TB1 Thermoblock; Biometra, Göttingen, Deutschland) für 5 min bei 95°C denaturiert. Die verdünnten Proben (je 10 µl) und ein Proteinstandard (5 µl, Bench Mark™ Prestained Protein Ladder; Invitrogen) wurden auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden alle Proben eines Patienten auf einem Gel aufgetrennt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde eine Spannung von 120 V für 1 h 45 min mittels eines Standard Power Pack P25 300 (Biometra) angelegt.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend auf eine Blot-Membran überführt. Hierfür wurden das Gel, die Blot-Membran (Protran BA83; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland), die Filterpapiere (Whatman, Maidstone, England) und die Fiber Pads (BioRad) in Blot-Puffer (25 mM Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 10% Methanol; alles Roth; Aqua dest.) präinkubiert. Das in einer Blot-Kassette eingespannte Gel-Sandwich wurde anschließend in die mit Blot-Puffer befüllte Blot-Apparatur installiert. Der Blot-Vorgang erfolgte für 50 min bei 400 mA.

Die entnommene Membran wurde in einem Gefäß mit TBS-T (*tris-buffered saline-tween* 0.1%)/2.5% Milchpulverlösung [TBS-T (100 ml 10×TBS (100 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.4), 1 ml Tween (Roth), 900 ml Aqua dest.)] präinkubiert. Nach 20 min wurde die Milchpulverlösung abgegossen und ein anti-MMP-2-mAk, der proMMP-2 und prozessierte MMP-2 erkennt (Klon 7F3.2; Chemicon, Hofheim, Deutschland), in einer Verdünnung von 1 : 5000 in TBS-T/2.5% Milchpulverlösung zur Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran auf einem Wipptisch (WT17; Biometra) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T auf dem Wipptisch bei RT gewaschen. Im Anschluss wurde ein mit HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierter anti-Maus-mAk (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1 : 1000 in TBS-T/2.5% Milchpulverlösung zur Membran gegeben, und die Membran für 1 h erneut auf dem Wipptisch bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran abermals dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T auf dem Wipptisch bei RT gewaschen.

In einem neuen Gefäß wurden der Membran jeweils 0.7 ml der zwei Substratlösungen (SuperSignal® West Femto Kit; Pierce, Perbio Science, Bonn, Deutschland) zugegeben und 5

min über der Membran verteilt. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Film (BioMax Light Film; Kodak, Steinheim, Deutschland) mit der Membran in eine Röntgenkassette gelegt und für eine Expositionsdauer von 30 sec entwickelt.

4.5.2 Bestimmung der proMMP-2-Konzentration mittels ELISA

Die proMMP-2-Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-System [„Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), human, Biotrak ELISA system“, Amersham Biosciences] nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dieses System beruht auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Es erkennt die inaktive Vorläuferform von MMP-2 (proMMP-2) sowohl in freier als auch in Komplex vorliegender Form, z. B. im proMMP-2/TIMP-2-Komplex. Es detektiert allerdings nicht die prozessierte MMP-2.

Je 100 µl der verdünnten Zellkulturüberstände wurden in die anti-MMP-2-mAk-beschichtete Mikrotiter (MT)-Platte pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Überstände abgenommen und die Vertiefungen viermal gewaschen. Danach wurden 100 µl eines Peroxidase-markierten anti-MMP-2-mAk (Amersham Biosciences) zugegeben, und die MT-Platte für 1 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Detektion durch Zugabe von 100 µl des „ready to use“-Substrates Tetramethylbenzidin (TMB; Amersham Biosciences). Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄ (Roth) gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem MT-Spektrophotometer (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland) gemessen. Die MMP-2-Konzentrationsbestimmung in den Probenüberständen erfolgte durch Interpolation aus der parallel ermittelten Standardkurve. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog zu 4.4.3.2 als prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS.

4.6 Bestimmungen der MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB

4.6.1 Bestimmung der Aktivität der prozessierten MMP-2 sowie der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels spezifischer Aktivitäts-Assays

Die Quantifizierung der MMP-2-Aktivität erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Aktivitäts-Assay-System [„Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Biotrak activity assay system“, Amersham Biosciences] nach Angaben des Herstellers. Einerseits wurde mit diesem für MMP-2 spezifischen Aktivitäts-Assay in den Überständen der GT- und RA-SFB die Aktivität der prozessierten MMP-2 bestimmt. Zum anderen wurde auch die Gesamt-MMP-2-Aktivität ermittelt, d. h. die Aktivität der prozessierten MMP-2 und der proMMP-2. Dies kann *in vitro* durch Zugabe von APMA (50 µl 0.5 mM je Loch) erreicht werden, das die vorher an den spezifischen Antikörper gebundene proMMP-2 aktiviert (Capper et al. 1999).

Der festphasengebundene spezifische Antikörper erfasst die prozessierte MMP-2 und proMMP-2 zu jeweils 100%, proMMP-2/TIMP-2-Komplexe zu 43%, prozessierte MMP-2/TIMP-2-Komplexe zu 8.6%, prozessierte MMP-2/TIMP-1-Komplexe zu 21% und MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 zu jeweils unter 1%. Die TIMP-gebundenen MMP-2-Formen bleiben in diesem Assay jedoch proteolytisch inaktiv und tragen daher nicht zur nachfolgend gemessenen Fluoreszenz bei (Capper et al. 1999).

Bei diesem System wurde MMP-2 aus jeweils 100 µl der verdünnten Zellkulturüberstände (1 : 2 für die Bestimmung der Aktivität der prozessierten MMP-2, 1 : 25 für die Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität) und aus den Standards durch einen anti-MMP-2-mAk an die MT-Platte gebunden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C und viermaligem Waschen erfolgte die Bestimmung der MMP-2-Aktivität durch Zugabe von 50 µl einer modifizierten Pro-Urokinase (Amersham Biosciences) (Verheijen et al. 1997). Diese Pro-Urokinase wurde durch gebundene, aktive MMP-2 in ihre aktive Form überführt und setzte das anschließend zugegebene Substrat S-2444TM (pyro-Glu-Gly-Arg-p-Nitroanilid; Amersham Biosciences) um. Dieser Substratumsatz wurde nach 4 h Inkubation bei 405 nm in einem MT-Spektrophotometer (Dynatech MR5000; Dynatech Laboratories, Billingshurst, England) photometrisch erfasst.

Zur Berechnung des Einflusses von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB auf die MMP-2-Aktivität wurden die Absorptionswerte eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog zu 4.4.3.2 als prozentuale Induktion der Aktivität im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS.

4.6.2 Bestimmung der Aktivität der prozessierten MMP-2 sowie der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels Zymographie

Die Zymographie ist eine semiquantitative Methode für die Bestimmung der MMP-2-Aktivität. Hierbei erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel, das als Substrat Gelatine enthält. Nach der Auftrennung erfolgt ein Inkubationsschritt. Nach Anfärben und anschließendem Entfärben sind in den Bereichen gelatinolytischer Aktivität Lysisbanden sichtbar. Bei der Gelatine-Zymographie ist sowohl die prozessierte MMP-2 als auch die proMMP-2 nachweisbar, weil die ursprünglich inaktive proMMP-2 während der Zymographie im SDS-Gel durch Denaturierungs-/Renaturierungsprozesse und autokatalytisches Schneiden aktiviert wird und somit gelatinolytisch wirkt. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes können die prozessierte MMP-2 (66 kDa) und die proMMP-2 (72 kDa) im Zymogramm voneinander unterschieden werden (Hawkes et al. 2001).

Für die SDS-PAGE wurde wie unter dem in 4.5.1 beschriebenen Protokoll ein Gel gegossen, in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und nach Auftragen der Proben und des Standards eine elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 120 V für 1 h 45 min durchgeführt. Es wurde hierfür lediglich ein anderer Probenpuffer (nach Laemmli: 0.625 M Tris-HCl, 70% Glycerol, 15% Bromphenolblau, 15% SDS; pH 6.8; alles Roth; Laemmli 1970) verwendet, um die Proben im Verhältnis 5 : 1 zu verdünnen. Auf das Gel wurden je 10 μ l der verdünnten Probe und 5 μ l Standard (Bench MarkTM Prestained Protein Ladder; Invitrogen) aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt. Das verbleibende Trenngel wurde in ein sauberes Kunststoffgefäß überführt und bei RT auf einem Wipptisch (Polymax 1040; Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) dreimal für 30 min mit jeweils 100 ml 2.5% Triton X-100 (Roth) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde das Gel ausgiebig mit Leitungswasser gewaschen. Hiernach wurden 100 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris-HCl; 5 mM

CaCl₂; 1 µM ZnCl₂; pH 7.6; alles Roth) zugegeben, und das Gefäß abgedeckt über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Inkubationspuffer abgegossen und das Gel mit einer 0.25% Coomassie-Lösung (0.25% Coomassie Brilliant Blue G 250; Serva, Heidelberg, Deutschland; 10% Essigsäure, 50% Methanol; beides Roth) für 30 min auf dem Wipptisch gefärbt. Anschließend wurde die restliche Coomassie-Lösung abgegossen und Entfärbelösung (25% Ethanol; 7% Essigsäure; alles Roth) dazugegeben. Das Gel wurde so lange entfärbt, bis eindeutige Lysisbanden sichtbar waren. Danach wurde die Entfärbelösung durch eine Konservierungslösung (10% Ethanol; 5% Glycerol; alles Roth) ersetzt. Als letzter Schritt wurde das Gel zwischen zwei Zellophanfolien (Roth) eingedeckt.

Für die Auswertung wurden die Gele mit einem Scanner (ScanMaker X12 USL; Microtek, Duisburg, Deutschland) in ein Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop 5.0 LE, San Jose, USA) eingelesen und digital gespeichert. Anschließend wurden die Bandenintensitäten jeweils zweimal mit dem Programm Scion Image bestimmt und daraus der jeweilige Mittelwert errechnet. Hierfür wurden über die Banden Regionen gleicher Größe gelegt und von dem so ermittelten Grauwert der Grauwert des Hintergrundes subtrahiert. Hierbei stellt die Bande bei einem Molekulargewicht von 66 kDa bzw. 72 kDa die prozessierte MMP-2 bzw. proMMP-2 dar. Ein Maß für die Gesamt-MMP-2-Aktivität ergibt sich somit durch Addition der Bandenintensitäten von prozessierter MMP-2 und proMMP-2 (Yamanaka et al. 2000). Die Ermittlung der prozentualen Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS erfolgte analog zu 4.4.3.2.

4.6.3 Bestimmung der Total-MMP-Aktivität mittels unspezifischer Aktivitäts-Assays

Zur Bestimmung der Total-MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB wurde das von Knight et al. (Knight et al. 1992) beschriebene Peptid (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-[3-(2,4-dinitrophenyl)-2,3-diaminopropionyl]-Ala-Arg-NH₂ (Bachem, Heidelberg, Deutschland) als Substrat verwendet. Bei Spaltung des Peptids in der Aminosäuresequenz Leu-Gly-Leu durch die MMP wird der Fluoreszenzfarbstoff (7-methoxycoumarin) vom Quencher (2,4-dinitrophenyl) abgetrennt, woraufhin der daraus resultierende Fluoreszenzanstieg gemessen werden kann. Tab. 5 zeigt die für dieses Signalpeptid vorliegenden Literaturdaten bezüglich der Spezifitätskonstanten

für die untersuchten MMP. Aufgrund der Zugabe von APMA werden sowohl prozessierte MMP als auch MMP-Zymogene bestimmt.

Tab. 5: Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_m ; $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8 und MMP-13 für die Hydrolyse des synthetischen Substratpeptids Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂

	Knight et al. 1992 (⁺ 25°C; [#] 37°C)	Knäuper et al. 1996 (25°C)	Fasciglione et al. 2000 (37°C)
MMP-1	1.48×10^4 [#]	1.21×10^4	n. b.
MMP-2	6.29×10^5 ⁺	n. b.	5.16×10^6
MMP-3	2.30×10^4 [#]	n. b.	n. b.
MMP-7	1.69×10^5 [#]	n. b.	n. b.
MMP-8	n. b.	1.93×10^5	1.12×10^7
MMP-9	n. b.	n. b.	4.42×10^6
MMP-13	n. b.	7.57×10^5	n. b.

n. b. = nicht bestimmt

Es wurden je 10 µl Probe 1 mM APMA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 70 µl Pufferlösung (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 30 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0.05% Brij[®] 35; pH 7.6; alles Roth) verdünnt und mit 20 µl von 25 µM Substratpeptid [in DMSO (Dimethylsulf-oxid) gelöst] in die Vertiefungen einer MT-Platte pipettiert. Die Platte wurde in einem MT-Spektrophotometer (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtechnologies) bei 37°C für 10 min präinkubiert. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium (Mediumkontrolle/1% FKS) verwendet. Die Anregung erfolgte bei 330 nm, die Fluoreszenzmessung bei 390 nm. Der Fluoreszenzanstieg wurde dann alle 5 min über einen Zeitraum von 145 min gemessen.

4.7 Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie

Die Reverse Zymographie stellt eine modifizierte Zymographie zur Detektion von TIMP dar und wurde bis auf die folgend genannten Unterschiede analog zu der unter 4.6.2 beschriebenen Zymographie durchgeführt. Während der SDS-PAGE dissoziieren die MMP/TIMP-Komplexe, wodurch auch die ursprünglich gebundenen TIMP in der Reversen Zymographie erfasst werden.

Für die Reverse Zymographie wird dem Gel neben dem Substrat Gelatine noch eine Gelatine-degradierende MMP (in der Regel MMP-2 oder MMP-9) beigelegt. Als MMP-2-Quelle diente konditioniertes Medium von cos-7-Zellen, die mit einem MMP-2-Vektor transfiziert wurden (pCR3.1GelA-Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Pei, University of Minnesota, USA, zur Verfügung gestellt; Pei 1999). In dem mit konditioniertem Medium gegossenen Trenngel (15%, 0.375 M Tris, pH 8.8) ist somit gleichmäßig eine definierte Menge an MMP-2 verteilt. Nach der Auspolymerisation wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (4%, 0.125 M Tris, pH 6.8) überlagert.

Nach der SDS-PAGE, der Inkubation über Nacht, der Färbung mittels 0.25% Coomassie-Lösung und der Entfärbung heben sich die Areale mit aktiven TIMP als blaue Banden gegen einen helleren Hintergrund ab. Der Grund hierfür ist die MMP-2-inhibierende Wirkung der TIMP, wodurch in den blau gefärbten Arealen keine Degradation der Gelatine durch MMP-2 stattfindet und das Gel folglich durch die Coomassie-Lösung angefärbt wird.

Die Reversen Zymogramme wurden in Zellophanfolien (Roth) eingedeckt, mit einem Scanner (ScanMaker X12 USL) eingelesen und digital gespeichert.

4.8 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS 10.0TM (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) verwendet. Die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test in exakter zweiseitiger Signifikanzbestimmung durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei $P \leq 0.05$ angenommen. Für die Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit zweiseitiger Signifikanz bestimmt. Die Korrelation wurde auf einem Niveau von $P \leq 0.05$ als signifikant angesehen.

5. ERGEBNISSE

Die graphische Darstellung des Datenmaterials erfolgte mittels Balkendiagrammen, in die zusätzlich die einzelnen Werte in Form von Punktediagrammen integriert wurden, um die Variabilität der Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten zu verdeutlichen. Die obere und untere Begrenzung der Fehlerbalken stellen beiderseitig den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Höhe der hinterlegten Balken den Mittelwert der Untersuchungsergebnisse. Werte außerhalb des Skalierungsbereiches wurden an die äußere Begrenzung der Diagramme gesetzt.

Obgleich der Mittelwert bei mehreren Stimulierungen über dem Kontrollwert (Mediumkontrolle/1% FKS) liegt, wurden hierbei Verminderungen angenommen. Diese Interpretation begründet sich auf dem Vorliegen vereinzelter Werte, die sich außerhalb von drei Standardabweichungen vom Mittelwert befinden und somit als Ausreißer bezeichnet werden. Bei Vorliegen einzelner Ausreißer und einer somit großen Streuung der Einzelwerte stellt der Median eine geeignetere Größe für die Charakterisierung einer Tendenz dar als der Mittelwert. In diesen Fällen wurde daher zur Veranschaulichung der Median eingezeichnet.

5.1 Charakterisierung der Patienten

Für die Charakterisierung der GT-Patienten standen die klinischen Parameter Alter der Patienten und die Erkrankungsdauer zur Verfügung. Für die Charakterisierung der RA-Patienten wurden das Alter der Patienten, die Erkrankungsdauer, die BSG (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit), der CRP-Spiegel sowie die Anzahl der erfüllten ARA-Kriterien herangezogen (siehe auch Tab. 3 auf Seite 45). Sowohl die BSG als auch der CRP-Spiegel sind unspezifische Indikatoren für systemische entzündliche Prozesse und Gewebeschädigungen und weisen bei verschiedenen systemischen Entzündungskrankheiten erhöhte Werte auf. Die ARA-Kriterien sind Klassifikationskriterien, die speziell für die RA erarbeitet wurden (Arnett et al. 1988). Jeder RA-Patient erfüllte mindestens vier der ARA-Kriterien.

Das Alter der Patienten, die Erkrankungsdauer und die Anzahl der ARA-Kriterien waren bei den RA-Patienten signifikant höher als bei den GT-Patienten bzw. höher als die in der Durchschnittspopulation geltenden Referenzbereiche für BSG und CRP (Tab. 6).

Tab. 6: Klinische Parameter der GT- und RA-Patienten zum Zeitpunkt der Synovektomie

	Alter (Jahre)	Erkrankungsdauer (Jahre)	BSG (mm/1 h)	CRP (mg/l)	# der ARA- Kriterien (RA)
GT	29.3 ± 5.8	0.36 ± 0.33	n. b.	n. b.	0.0 ± 0.0
RA	64.3 ± 4.2*	19.3 ± 6.3*	37.5 ± 7.5	24.0 ± 8.7	4.8 ± 0.5*

Die Daten geben den Mittelwert mit Standardfehler an.

* $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus GT; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; CRP = C-reaktives Protein; ARA = American Rheumatism Association; n. b. = nicht bestimmt

5.2 Charakterisierung der mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads negativ gereinigten SFB von GT- und RA-Patienten

Für die vergleichenden Untersuchungen an GT- und RA-SFB unter dem Einfluss von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB wurden SFB aus der SM von jeweils 6 GT- und RA-Patienten isoliert. Die Zellen wurden mittels Kollagenaseverdau aus der SM gewonnen und mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads von kontaminierenden Makrophagen gereinigt (Zimmermann et al. 2001). Um die Reinheit der negativ-gereinigten GT- und RA-SFB zu charakterisieren, wurde der Prozentsatz von CD90⁺, Prolyl-4-Hydroxylase⁺, CD11b⁺ und CD14⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. CD90 und Prolyl-4-Hydroxylase wurden als Fibroblastenmarker eingesetzt, CD11b und CD14 dienten als Marker für Monozyten/Makrophagen.

In den GT- und RA-SFB war der Prozentsatz von CD90⁺ Zellen signifikant niedriger als der jeweilige Prozentsatz von Prolyl-4-Hydroxylase⁺ Zellen (Tab. 7). Die GT-SFB wiesen einen im Vergleich zu RA-SFB signifikant höheren Prozentsatz von CD90⁺ Zellen sowie von Prolyl-4-Hydroxylase⁺ Zellen auf. Sowohl bei GT- als auch bei RA-SFB waren weniger als 2% der Zellen positiv für die Monozyten-/Makrophagenmarker CD11b und CD14.

Tab. 7: Prozentsatz CD90⁺, Prolyl-4-Hydroxylase⁺, CD11b⁺ und CD14⁺ SFB nach Reinigung der Zellen mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads

	CD90	Prolyl-4-Hydroxylase	CD11b	CD14	<i>in vitro</i> Kultur (Tage)
	mAk	AS02	3-2B12	TM316	TÜK4
GT-SFB	96.7 ± 1.5* ⁺	99.6 ± 0.1 ⁺	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	26.5 ± 2.3
RA-SFB	62.1 ± 8.3*	94.3 ± 1.6	1.6 ± 0.4	1.1 ± 0.3	27.8 ± 3.3

Der Prozentsatz von SFB, der eine positive Färbung für die untersuchten Marker aufwies, wurde nach der 1. Passage (GT-SFB) bzw. direkt nach CD14-Reinigung (RA-SFB) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Weiterhin ist die mittlere Gesamtkulturdauer der SFB von der Isolierung aus der SM bis zur Verwendung in den Experimenten (Beginn der 3. Passage bei GT-SFB, Beginn der 2. Passage bei RA-SFB) ersichtlich. Die Daten geben den Mittelwert und Standardfehler an.

* $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus Prolyl-4-Hydroxylase. ⁺ $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus RA-SFB. CD = cluster of differentiation; mAk = monoklonaler Antikörper; RA = rheumatoide Arthritis; GT = Gelenktrauma; SFB = synoviale Fibroblasten

In einigen Zellisolierungen konnte keine ausreichend hohe Zellzahl gewonnen werden, um die Experimente mit Zellen der Negativfraktion durchzuführen. Daher wurden die Zellen nach der Reinigung weiterkultiviert und am Anfang der 3. Passage (GT-SFB) bzw. 2. Passage (RA-SFB) für die Experimente verwendet. Bei SFB von GT-Patienten betrug die Gesamtkulturdauer bis zum Ende der 2. Passage 26.5 ± 2.3 Tage und bei SFB von RA-Patienten bis zum Ende der 1. Passage 27.8 ± 3.3 Tage. Die Kulturdauer der SFB von GT- und RA-Patienten wies keinen signifikanten Unterschied auf.

5.3 Bestimmung der MMP-2-mRNA-Expression in stimulierten GT- und RA-SFB mittels Realtime-PCR

Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB: IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB hatten im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von MMP-2 in GT- und RA-SFB (Abb. 11).

Die Realtime-PCR detektierte in GT-SFB nach der Stimulierung mit 50 U/ml IL-1 β , 1 ng/ml TNF- α und 5 U/ml PDGF-BB eine numerisch um jeweils mind. 50% gesteigerte MMP-2-mRNA-Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS (Abb. 11).

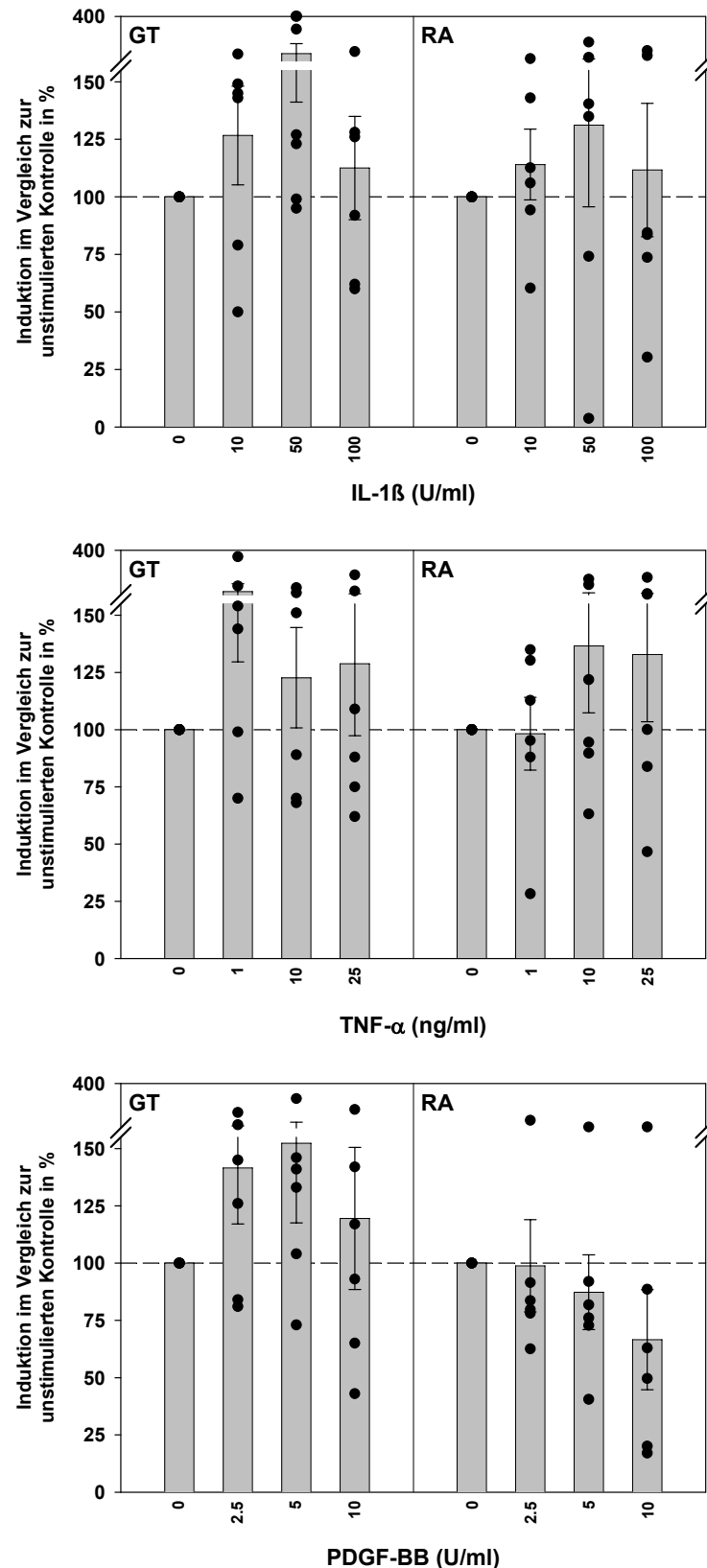


Abb. 11: Realtime-PCR (MMP-2-mRNA-Expression)

Induktion der MMP-2-mRNA-Expression in GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils n = 6). Die gestrichelte Linie gibt die MMP-2-mRNA-Expression ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an.

5.4 Bestimmung des MMP-2-Proteins in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB

5.4.1 Spezifische MMP-2-Detektion mittels Western-Blot

Repräsentativ für alle Proben wurde exemplarisch ein Western-Blot einer GT-Probe durchgeführt, um MMP-2 spezifisch mittels Chemolumineszenz nachzuweisen. Wie der Western-Blot in Abb. 12 zeigt, konnte in der Mediumkontrolle/1% FKS und nach jeder Stimulierung mit IL-1 β , PDGF-BB und TNF- α jeweils eine Bande bei ca. 72 kDa qualitativ detektiert werden, die mit dem Molekulargewicht der proMMP-2 übereinstimmt.

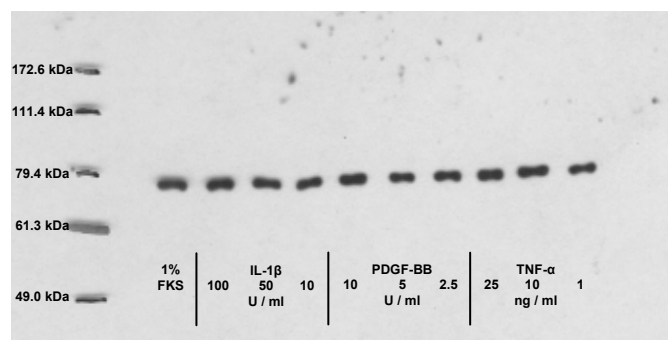


Abb. 12: Detektion von proMMP-2 in GT-SFB (Western-Blot)

In der Mediumkontrolle/1% FKS und nach jeder Stimulierung mit IL-1 β , PDGF-BB und TNF- α ist proMMP-2 bei ca. 72 kDa spezifisch nachweisbar.

5.4.2 Bestimmung der proMMP-2-Konzentration mittels ELISA

Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB: IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB führten im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS weder in GT- noch in RA-SFB zu signifikanten Unterschieden in der proMMP-2-Konzentration (Abb. 13).

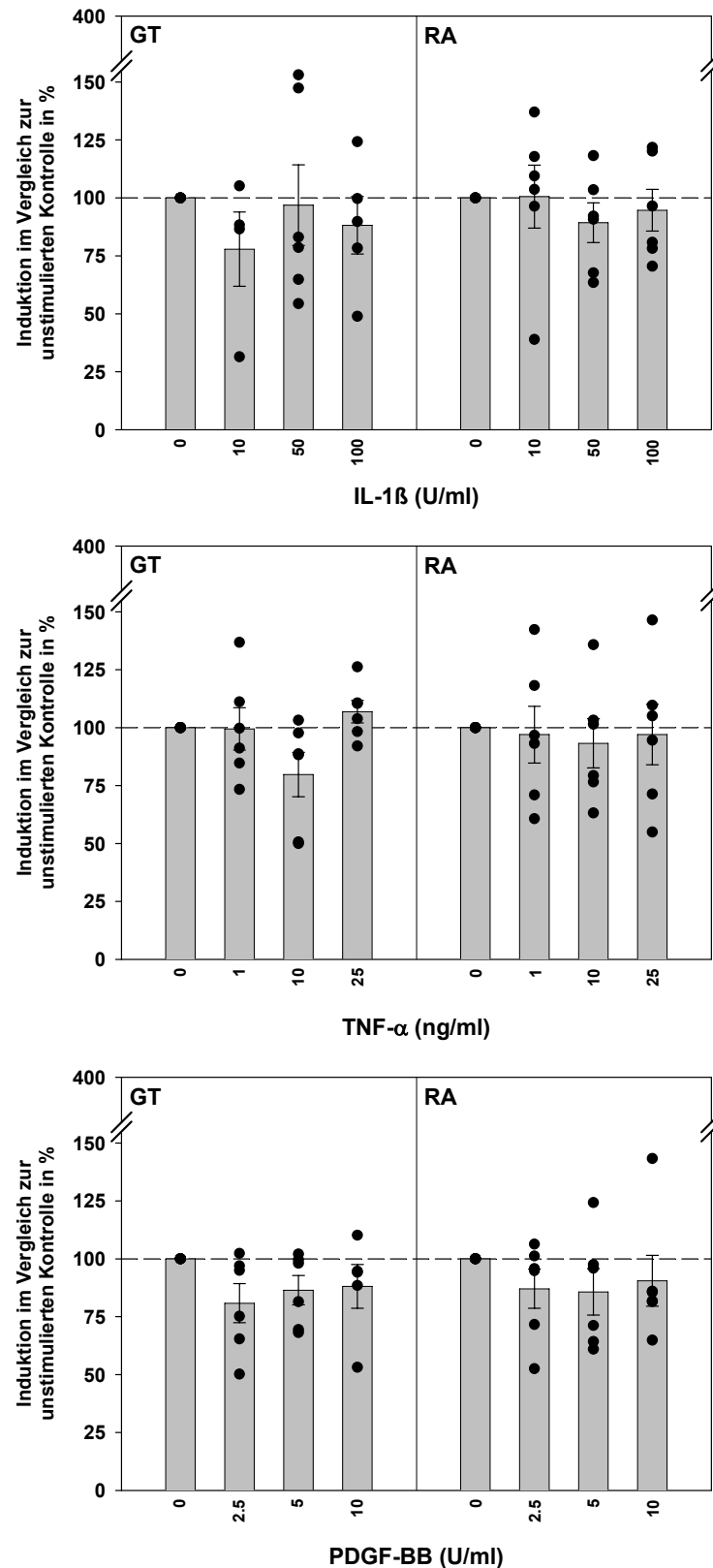


Abb. 13: ELISA (proMMP-2-Konzentration)

Induktion der proMMP-2-Konzentration in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils n = 6; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: n = 4, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die proMMP-2-Konzentration ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an.

5.5 Bestimmungen der MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT- und RA-SFB

Aus den Überständen der stimulierten GT- und RA-SFB wurde die Gesamt-MMP-2-Aktivität sowie die Aktivität der prozessierten MMP-2 mittels spezifischen Aktivitäts-Assays und Zymographie ermittelt. Dabei stellt die Gesamt-MMP-2-Aktivität die Aktivität aus sowohl prozessierter MMP-2 als auch proMMP-2 dar. Ferner wurde die Total-MMP-Aktivität mittels eines unspezifischen Aktivitäts-Assays bestimmt (Knight et al. 1992).

5.5.1 Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität

5.5.1.1 Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels spezifischer Aktivitäts-Assays mit APMA

Der mit APMA durchgeführte, spezifische Aktivitäts-Assay erfasst neben der prozessierten MMP-2 auch die proMMP-2 (siehe 4.6.1 und Abb. 10, S. 43).

Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB: IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB hatten im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS in allen eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamt-MMP-2-Aktivität in GT- oder RA-SFB (Abb. 14).

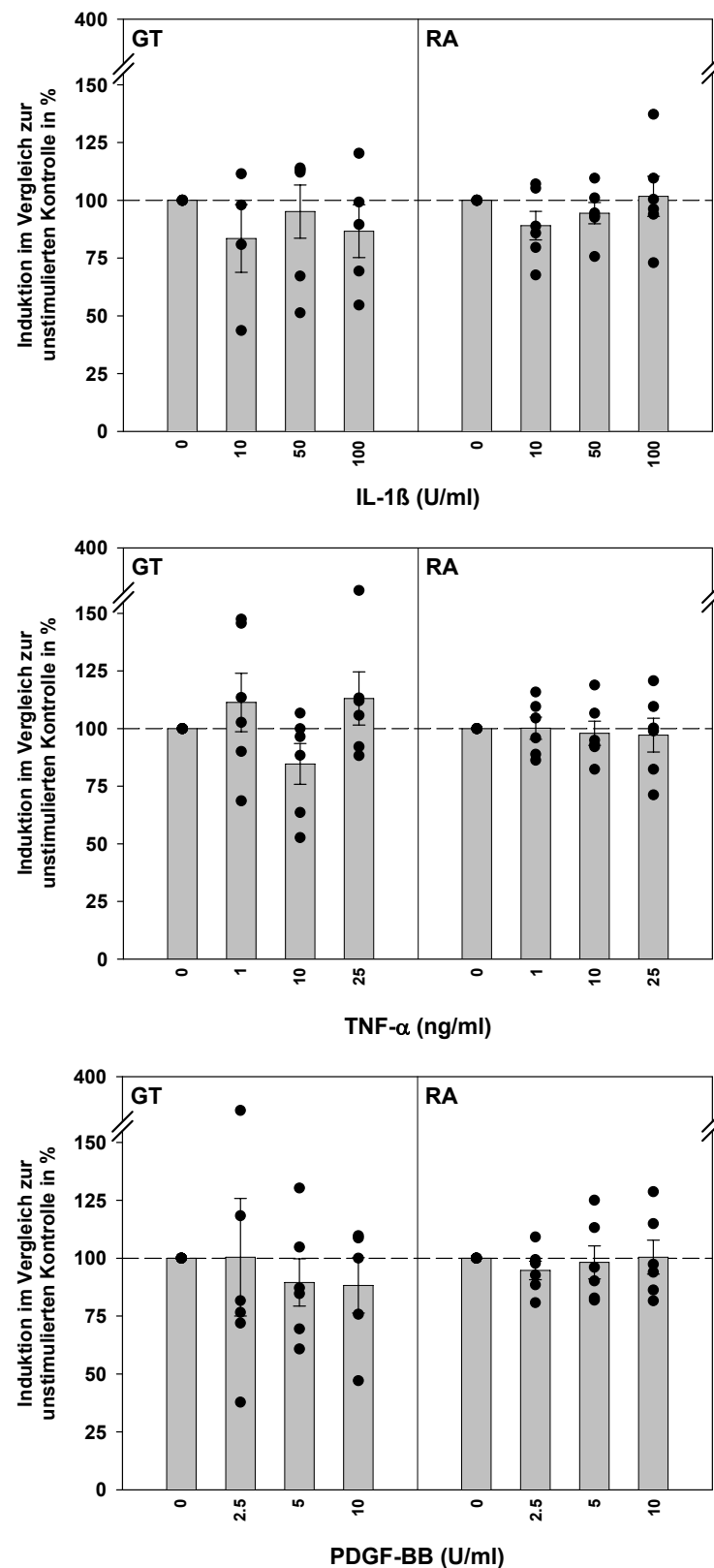


Abb. 14: Spezifischer Aktivitäts-Assay mit APMA (Gesamt-MMP-2-Aktivität)
Induktion der Gesamt-MMP-2-Aktivität in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils n = 6; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: n = 4, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die Gesamt-MMP-2-Aktivität ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an.

5.5.1.2 Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels Zymographie

Neben dem spezifischen Aktivitäts-Assay wurde die Gesamt-MMP-2-Aktivität mittels Zymographie ermittelt. Hierfür wurden für jede Probe die Intensitäten der Bande der proMMP-2 bei 72 kDa und der prozessierten MMP-2 bei 66 kDa (Abb. 15) addiert und wie unter 4.4.3.2 erläutert ausgewertet.

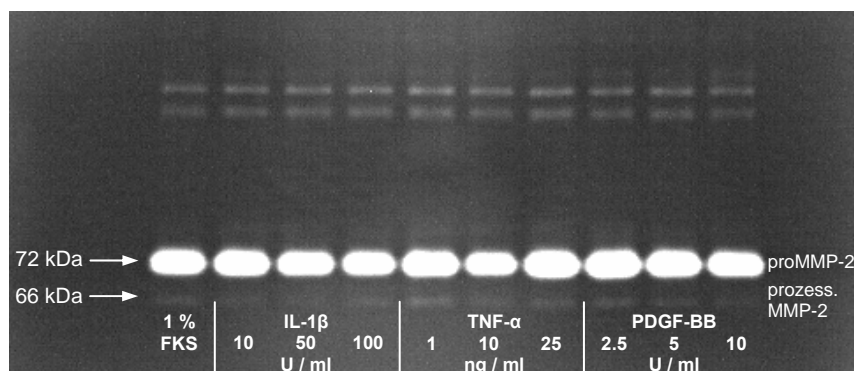


Abb. 15: Beispiel zur Bestimmung der MMP-2-Aktivität in GT-SFB (Zymographie)

Auf der Bahn 1 ist die Probe mit der Mediumkontrolle/1% FKS aufgetragen. Die folgenden Bahnen stellen die Proben mit den Stimulierungen in jeweils zunehmender Konzentration dar (IL-1 β : Bahnen 2-4; TNF- α : Bahnen 5-7; PDGF-BB: Bahnen 8-10).

Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB: IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB hatten im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS in allen eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamt-MMP-2-Aktivität in GT- oder RA-SFB (Abb. 16).

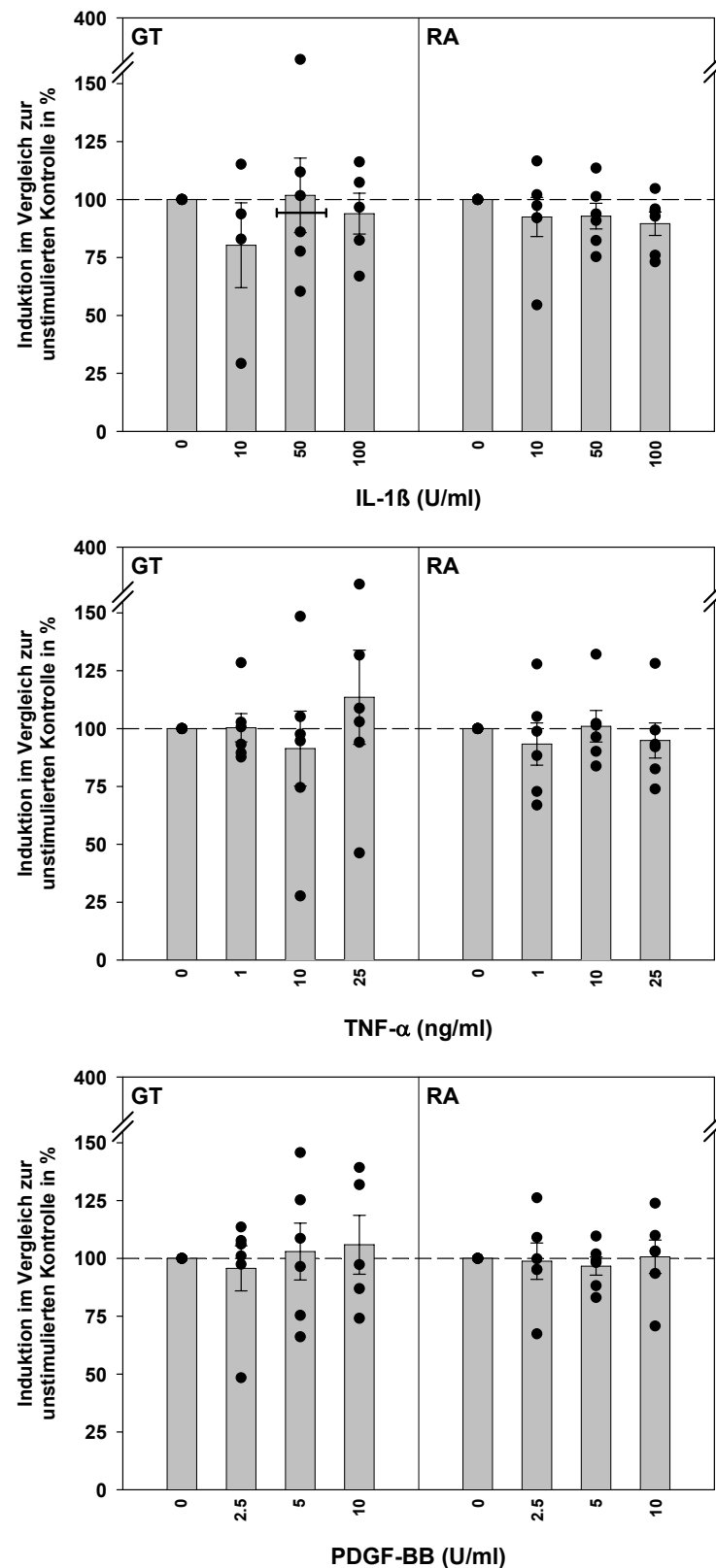


Abb. 16: Zymographie (Gesamt-MMP-2-Aktivität)

Induktion der Gesamt-MMP-2-Aktivität in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils $n = 6$; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: $n = 4$, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: $n = 5$). Die gestrichelte Linie gibt die Gesamt-MMP-2-Aktivität ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an. — Median der Einzelwerte.

5.5.2 Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2

5.5.2.1 Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2 mittels spezifischer Aktivitäts-Assays ohne APMA

Eingangs sei erneut erwähnt, dass der spezifische Aktivitäts-Assay ohne Zugabe von APMA einzig die prozessierte MMP-2 erkennt (siehe 4.6.1 und Abb. 10, S. 43).

Stimulierung mit IL-1 β : IL-1 β bewirkte bei GT-SFB in einer Konzentration von 10 U/ml eine im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikante Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 (Abb. 17). IL-1 β hatte im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der prozessierten MMP-2 in RA-SFB.

Stimulierung mit TNF- α : TNF- α führte bei GT-SFB in einer Konzentration von 1 ng/ml zu einer im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikanten Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2. TNF- α hatte im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der prozessierten MMP-2 in RA-SFB.

Stimulierung mit PDGF-BB: Die Stimulierung der GT-SFB mit 10 U/ml PDGF-BB hatte eine im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikante Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 zur Folge. Die Stimulierung der RA-SFB mit 10 U/ml PDGF-BB führte zu einer im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikanten Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 um ca. 67%. Als signifikant niedriger erwies sich die Aktivität der prozessierten MMP-2 bei RA-SFB im Vergleich zu GT-SFB nach Stimulierung mit 10 U/ml PDGF-BB.

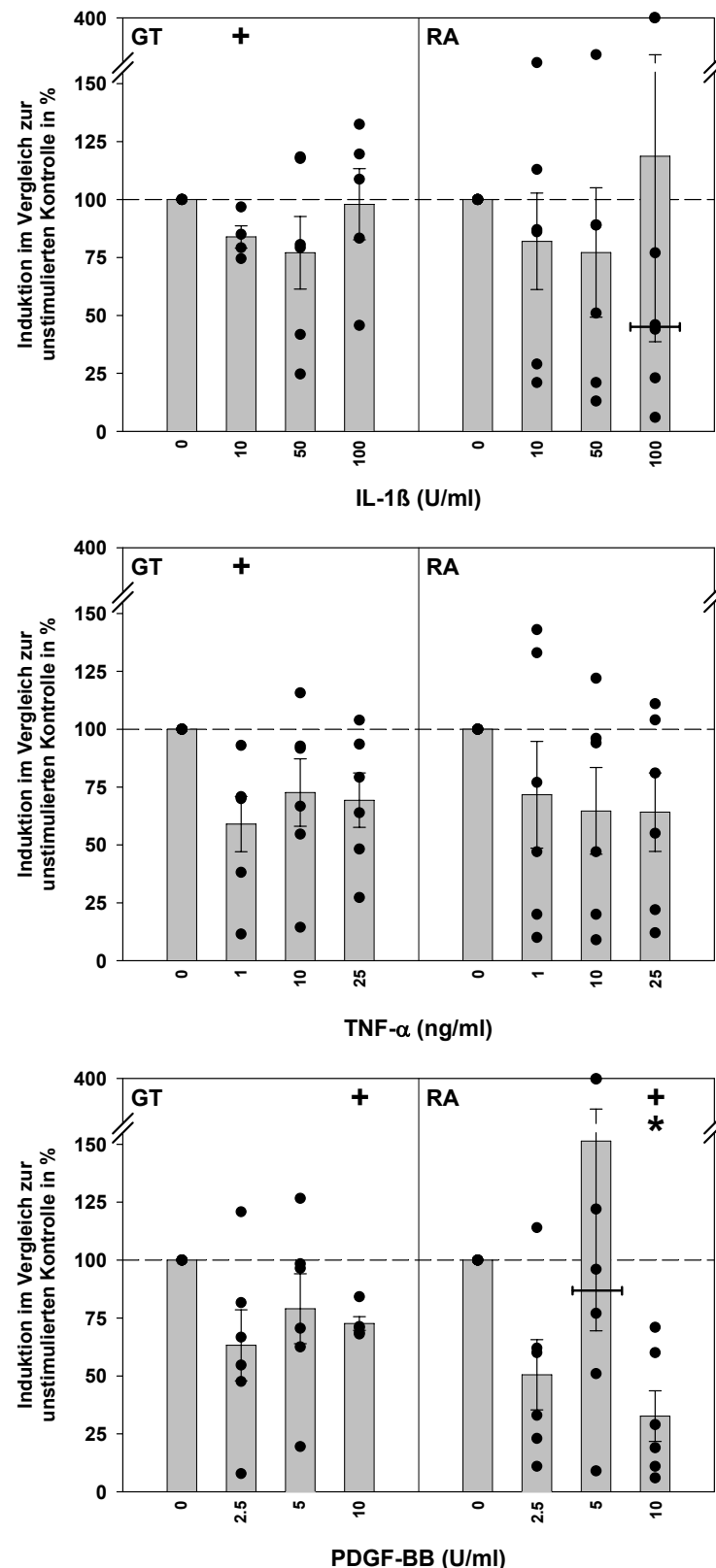


Abb. 17: Spezifischer Aktivitäts-Assay ohne APMA (Aktivität der prozessierten MMP-2)
Induktion der Aktivität der prozessierten MMP-2 in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils n = 6; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: n = 4, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die Aktivität der prozessierten MMP-2 ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an. + $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus 1% FKS. * $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus 10 U/ml PDGF-BB (GT). — Median der Einzelwerte.

5.5.2.2 Aktivitätsbestimmung der prozessierten MMP-2 mittels Zymographie

Wie bereits für die Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität wurde auch die Aktivität der prozessierten MMP-2 mittels Zymographie ermittelt. Hierbei wurde für jede Probe jedoch einzig die der prozessierten MMP-2 entsprechende Intensität der Bande bei 66 kDa (siehe Abb. 15, S. 68) wie unter 4.4.3.2 erläutert ausgewertet.

Stimulierung mit IL-1 β : IL-1 β führte im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS weder in GT- noch in RA-SFB zu einem signifikanten Unterschied auf die Aktivität der prozessierten MMP-2 (Abb. 18).

Die Stimulierung mit 50 U/ml IL-1 β führte bei GT-SFB numerisch zu einer um ca. 73% gesteigerten Aktivität der prozessierten MMP-2 im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS.

Stimulierung mit TNF- α : TNF- α führte bei GT-SFB in den Konzentrationen 1 und 10 ng/ml zu einer im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikanten Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 um ca. 69% bzw. 62%.

Stimulierung mit PDGF-BB: PDGF-BB bewirkte bei GT-SFB in einer Konzentration von 2.5 U/ml eine im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikante Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2.

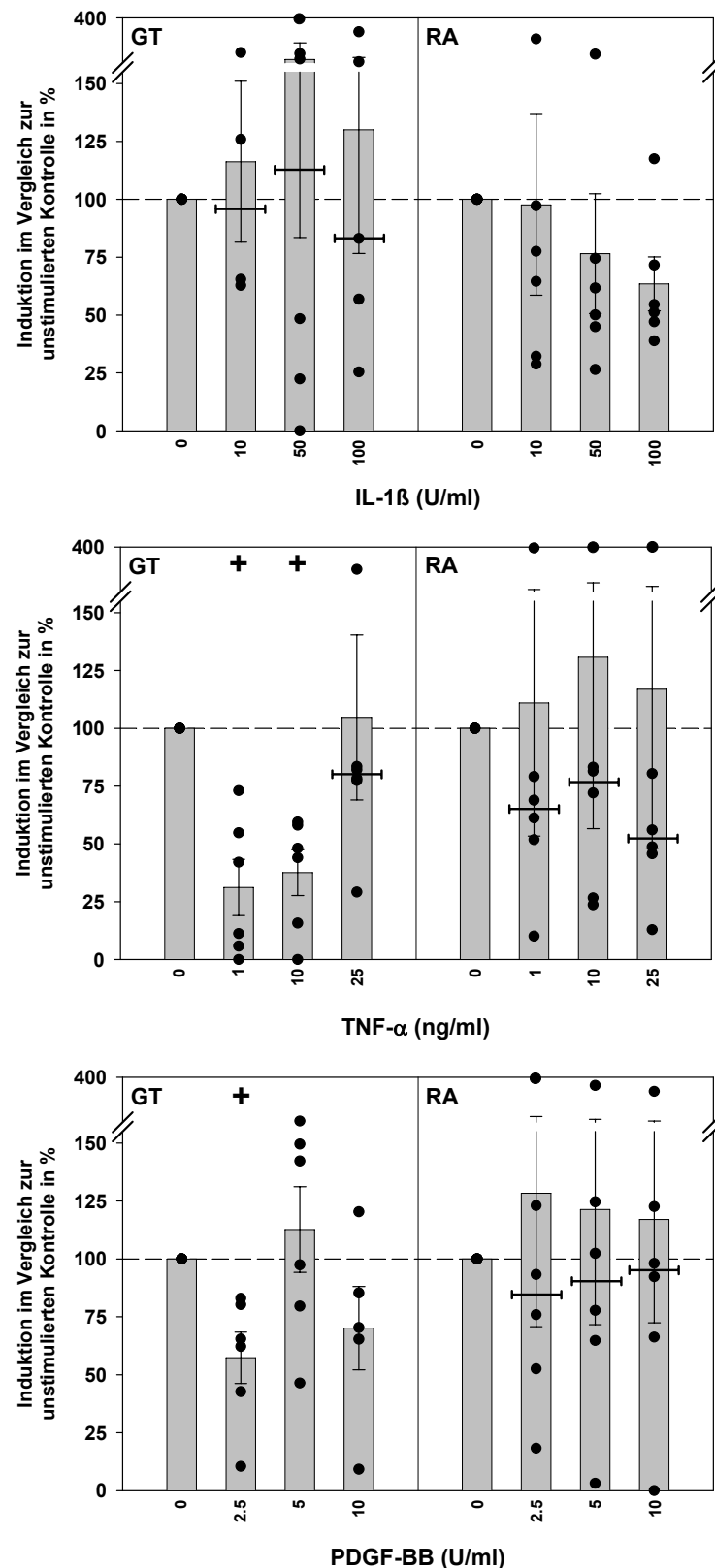


Abb. 18: Zymographie (Aktivität der prozessierten MMP-2)
Induktion der Aktivität der prozessierten MMP-2 in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils n = 6; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: n = 4, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die Aktivität der prozessierten MMP-2 ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1 % FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an. + $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus 1 % FKS. — Median der Einzelwerte.

5.5.3 Bestimmung der Total-MMP-Aktivität

Der eingesetzte unspezifische Aktivitäts-Assay weist unterschiedliche Spezifitätskonstanten für einzelne MMP auf, deren Kenntnis für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung ist (siehe 4.6.3, S. 57).

Stimulierung mit IL-1 β : In den Überständen von GT-SFB wurde nach Stimulierung mit IL-1 β in den Konzentrationen 10 und 100 U/ml im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS eine signifikante Verminderung der Total-MMP-Aktivität beobachtet (Abb. 19). IL-1 β hatte bei RA-SFB im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS keinen signifikanten Einfluss auf die Total-MMP-Aktivität.

Stimulierung mit TNF- α : TNF- α hatte in allen eingesetzten Konzentrationen weder bei GT- noch bei RA-SFB einen im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikanten Einfluss auf die Total-MMP-Aktivität.

Stimulierung mit PDGF-BB: PDGF-BB führte bei GT-SFB in den Konzentrationen 2.5 und 10 U/ml, bei RA-SFB in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS signifikanten Verminderung der Total-MMP-Aktivität.

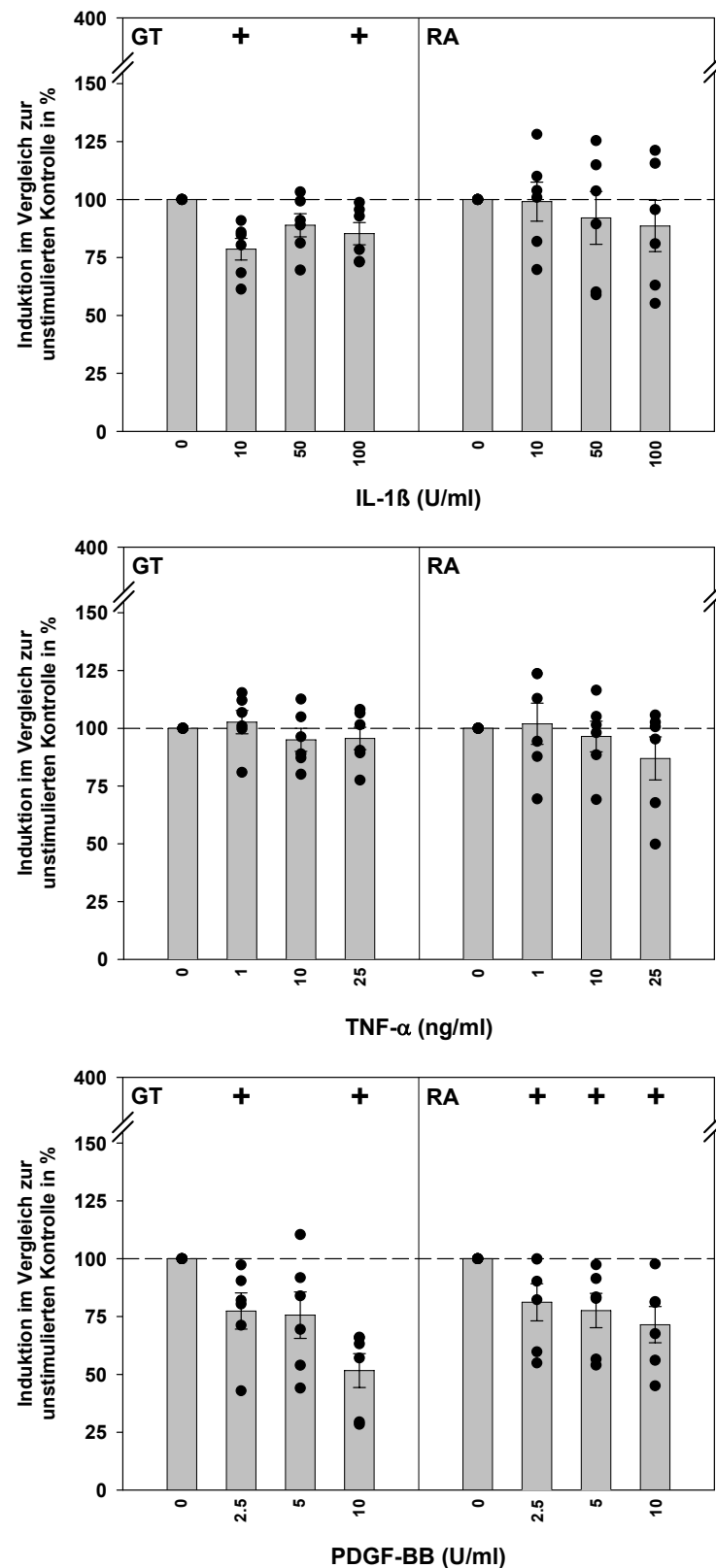


Abb. 19: Unspezifischer Aktivitäts-Assay (Total-MMP-Aktivität)

Induktion der Total-MMP-Aktivität in den Überständen von GT- und RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB (jeweils $n = 6$; Ausnahmen bei GT-SFB: IL-1 β 10 U/ml: $n = 4$, IL-1 β 100 U/ml und PDGF-BB 10 U/ml: $n = 5$). Die gestrichelte Linie gibt die Total-MMP-Aktivität ohne Stimulierung in Kulturmedium mit 1% FKS (Kontrolle) wieder. Die Punkte stellen die Einzeldaten dar. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler an. + $P \leq 0.05$ Mann-Whitney U-Test versus 1% FKS.

5.6 Absolutwerte der Protein- und Aktivitätsbestimmungen

Im ELISA sowie im spezifischen und unspezifischen Aktivitäts-Assay wurden auch die Absolutwerte ermittelt. Beim spezifischen Aktivitäts-Assay handelt es sich hierbei um die Darstellung der Gesamt-MMP-2-Aktivität (freie prozessierte MMP-2 *und* freie proMMP-2) über die gemessene Absorption. Tab. 8 sind die Mittelwerte mit Standardfehler der unstimulierten Proben (Mediumkontrolle/1% FKS) zu entnehmen.

Die große Variabilität der proMMP-2-Konzentration in den verschiedenen Patientenproben zeigt sich an den Schwankungsbereichen von 214 bis 946 ng/ml in den GT-Proben bzw. von 306 bis 769 ng/ml in den RA-Proben. Die Absolutwerte im ELISA sowie im spezifischen und unspezifischen Aktivitäts-Assay wiesen zwischen den unstimulierten GT- und RA-Proben (Mediumkontrolle/1% FKS) keine signifikanten Unterschiede auf.

Tab. 8: Absolutwerte der proMMP-2-Konzentration, Gesamt-MMP-2-Aktivität und Total-MMP-Aktivität

	proMMP-2-Konzentration (ng/ml)	Gesamt-MMP-2-Aktivität (Absorption, relative Einheiten)	Total-MMP-Aktivität (Fluoreszenz, relative Einheiten)
GT	546.3 ± 112.8	0.612 ± 0.110	4509.0 ± 1530.6
RA	532.9 ± 76.0	0.506 ± 0.112	4165.8 ± 1280.1

Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert ± Standardfehler der Absolutwerte in den Mediumkontrollen/1% FKS.

5.7 Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie

Anhand der Reversen Zymogramme konnten in allen Überständen von stimulierten GT-SFB MMP-2-inhibierende TIMP nachgewiesen werden. Wie aus Abb. 20 exemplarisch ersichtlich wurden TIMP nach jedem Stimulationsversuch und auch in der Mediumkontrolle/1% FKS in großer Menge detektiert. Anhand der Molekulargewichte lassen sich TIMP-1 (28 kDa), TIMP-2 (21 kDa), TIMP-3 (24 kDa) und TIMP-4 (23 kDa) identifizieren. Hierbei stellt TIMP-1 offensichtlich den größten Anteil der TIMP. Die Darstellung der TIMP im Reversen Zymogramm belegt weiterhin, dass sie in ihrer aktiven, MMP-inhibierenden Form vorliegen. Außerdem stellen sich im oberen Bereich des Reversen Zymogramms die prozessierte MMP-2 und proMMP-2 anhand der verstärkten Entfärbung des Gels dar.

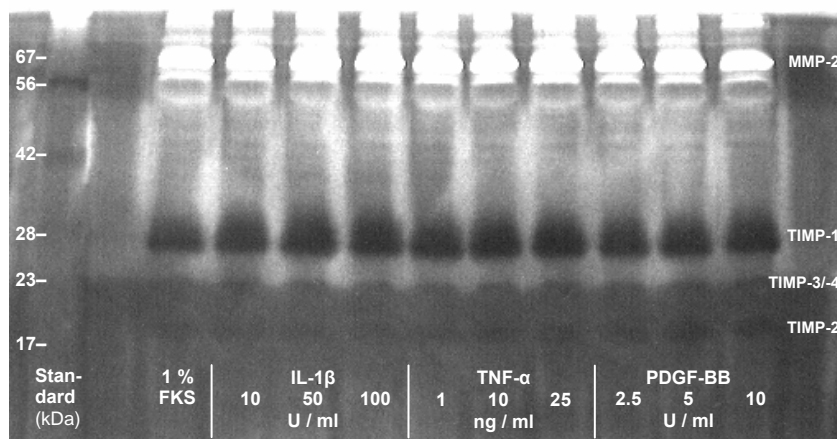


Abb. 20: Beispiel zum Nachweis von TIMP in den Überständen von GT-SFB (Reverse Zy-mographie)

Auf Bahn 1 ist der Standard, auf Bahn 3 die Mediumkontrolle/1% FKS aufgetragen. Die folgenden Bahnen zeigen die Darstellung der TIMP in den Überständen von GT-SFB nach Stimulierung mit den jeweils angegebenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB.

5.8 Korrelationsanalysen

Bei Betrachtung der Korrelationen zwischen verschiedenen klinischen Parametern von RA-Patienten fand sich eine positive Korrelation des CRP-Spiegels mit der Anzahl der erfüllten ARA-Kriterien ($r = 0.845$; $P = 0.034$, $n = 6$).

Um für die Versuchsergebnisse einen statistisch relevanten Bezug zum klinischen Kontext zu überprüfen, wurden Korrelationsanalysen zwischen den Versuchsergebnissen und den klinischen Parametern Alter des Patienten, Erkrankungsdauer, CRP-Spiegel, BSG und Anzahl der ARA-Kriterien (siehe Tab. 3, S. 45) durchgeführt. Die Korrelationsanalysen sind auf die RA-Ergebnisse beschränkt (Tab. 9), da die grundsätzlich gesunden GT-Patienten keine chronischen Begleiterkrankungen aufwiesen und somit keiner weitergehenden klinischen Charakterisierung unterzogen wurden.

Bei den Korrelationsanalysen zwischen den Versuchsergebnissen in RA-SFB nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB und den o. g. klinischen Parameter wurden nur die Korrelationen als bedeutsam gewertet und nachstehend aufgeführt, die kumulativ vorlagen, d. h. die zwischen mindestens zwei Konzentrationen des gleichen Zytokins und einem klinischen Parameter auftraten.

Der ELISA zeigte positive Korrelationen zwischen der proMMP-2-Konzentration und der Erkrankungsdauer nach Stimulierung der RA-SFB mit TNF- α (prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS).

Der unspezifische Aktivitäts-Assay zeigte positive Korrelationen zwischen der absoluten Total-MMP-Aktivität und dem CRP-Spiegel nach Stimulierung der RA-SFB mit TNF- α bzw. PDGF-BB. Außerdem zeigte der unspezifische Aktivitäts-Assay positive Korrelationen zwischen der absoluten Total-MMP-Aktivität und der Anzahl der ARA-Kriterien nach Stimulierung der RA-SFB mit PDGF-BB.

Der unspezifische Aktivitäts-Assay zeigte negative Korrelationen zwischen der Total-MMP-Aktivität und dem Alter der Patienten nach Stimulierung der RA-SFB mit IL-1 β (prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS).

Tab. 9: Korrelationen zwischen den Versuchsergebnissen und klinischen Parametern der RA-Patienten

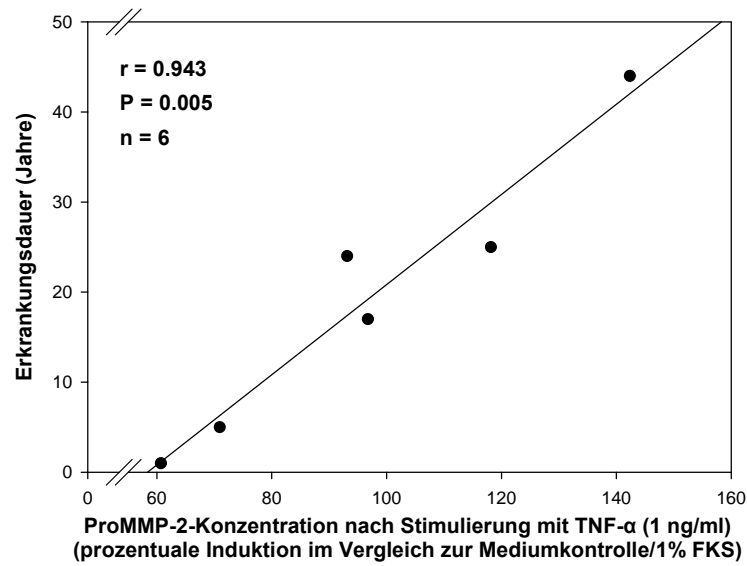
Dargestellt sind auf dem Niveau von $P \leq 0.05$ signifikante Korrelationen. Die grau hinterlegten Korrelationen sind nachfolgend graphisch dargestellt.

proz. = prozentuale Induktion zur Mediumkontrolle/1% FKS; r = Korrelationskoeffizient nach Spearman; P = Signifikanzniveau; n = Anzahl

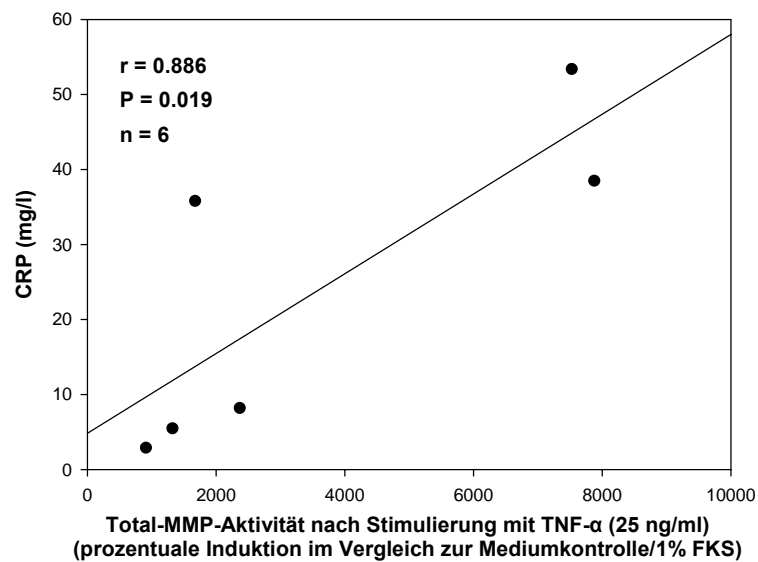
Methode	Klinischer Parameter	IL-1 β (U/ml)			TNF- α (ng/ml)			PDGF-BB (U/ml)		
		10	50	100	1	10	25	2.5	5	10
ELISA (proz.)	Erkrankungsdauer				r = 0.943 P = 0.005 n = 6	r = 0.829 P = 0.042 n = 6	r = 0.829 P = 0.042 n = 6			
Unspezifischer Aktivitäts-Assay (Absolutwerte)	CRP-Spiegel				r = 0.886 P = 0.019 n = 6	r = 0.943 P = 0.005 n = 6	r = 0.886 P = 0.019 n = 6	r = 0.943 P = 0.005 n = 6	r = 0.943 P = 0.005 n = 6	r = 0.829 P = 0.042 n = 6
	# ARA-Kriterien							r = 0.845 P = 0.034 n = 6	r = 0.845 P = 0.034 n = 6	r = 0.845 P = 0.034 n = 6
Unspezifischer Aktivitäts-Assay (proz.)	Alter des Patienten		r = -0.886 P = 0.019 n = 6	r = -0.886 P = 0.019 n = 6						

Zur Veranschaulichung folgen exemplarisch graphische Darstellungen der in Tab. 9 grau hinterlegten Korrelationen (Abb. 21).

A



B



C

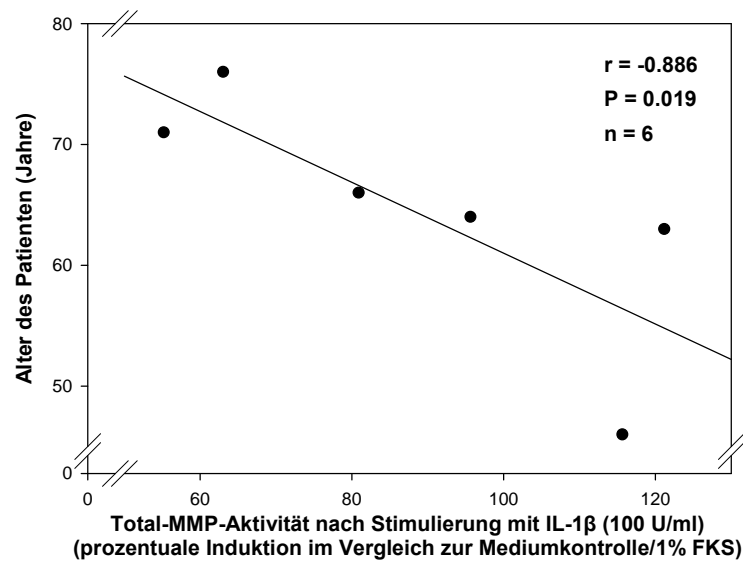


Abb. 21: Korrelationen zwischen der proMMP-2-Konzentration und der Total-MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten RA-SFB und klinischen Parametern

5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse aller Analysen an stimulierten GT- und RA-SFB, bei denen die prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS ermittelt wurde, sind als zusammenfassende Übersicht in einer Abbildung (Abb. 22) dargestellt. Für die Resultate ergab sich keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit von den eingesetzten Stimulierungen mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB. Dies kann auf die teilweise sehr starke Variabilität der Versuchsergebnisse zurückgeführt werden. Aus diesem Grund werden die individuell eingesetzten Konzentrationen an dieser Stelle nicht mehr getrennt, sondern zusammengefasst betrachtet.

Zusammenfassend führte keine der eingesetzten Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB - weder bei GT- noch bei RA-SFB - zu signifikanten Veränderungen der MMP-2-mRNA-Expression (siehe nachfolgende Tab. 10 und Abb. 22; Realtime-PCR; ❶) und proMMP-2-Konzentration (ELISA; ❷). Dies trifft auch auf den spezifischen Aktivitäts-Assay mit APMA (❸) und die Zymographie (Addition der Banden bei 72 kDa und 66 kDa; ❹) zu, d. h. bei der Analyse der Gesamt-MMP-2-Aktivität (Summe der Aktivität aus proMMP-2 und prozessierter MMP-2).

Im Gegensatz dazu zeigten sich jedoch folgende signifikante Einflüsse von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB auf die Aktivität der prozessierten MMP-2 im spezifischen Aktivitäts-Assay (ohne Zugabe von APMA; ❺) bzw. in der Zymographie (66 kDa Bande; ❻) sowie auf die Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay (❼):

Stimulierung mit IL-1 β : IL-1 β führte im Aktivitäts-Assay ohne APMA (❺) zu einer signifikanten Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 bei GT-SFB, wohingegen kein signifikanter Einfluss bei RA-SFB beobachtet wurde. In der Zymographie (❻) fanden sich durch die Stimulierungen mit IL-1 β weder bei GT- noch bei RA-SFB signifikante Einflüsse auf die Aktivität der prozessierten MMP-2. Weiterhin wurde die Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay (❼) durch IL-1 β nur bei GT-SFB signifikant vermindert.

Stimulierung mit TNF- α : Durch TNF- α wurde bei GT-SFB die Aktivität der prozessierten MMP-2 im Aktivitäts-Assay (❺) und in der Zymographie (❻) signifikant vermindert, bei RA-SFB fanden sich hingegen keine signifikanten Einflüsse von TNF- α . Weder bei GT- noch bei RA-SFB zeigten sich nach den Stimulierungen mit TNF- α signifikante Veränderungen bei der Untersuchung der Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay (❼).

Stimulierung mit PDGF-BB: Im Aktivitäts-Assay ohne APMA (❶) wurde die Aktivität der prozessierten MMP-2 durch PDGF-BB sowohl bei GT- als auch bei RA-SFB signifikant vermindert, wobei die Aktivität nach Stimulierung mit 10 U/ml PDGF-BB bei RA-SFB signifikant niedriger war als bei GT-SFB. In der Zymographie (❷) konnte die signifikante Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 nach Stimulierung mit PDGF-BB lediglich bei GT-SFB bestätigt werden. Dagegen wurde die Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay (❸) durch PDGF-BB sowohl bei GT- als auch bei RA-SFB signifikant vermindert.

Tab. 10: Übersicht über die eingesetzten Methoden und die erfassten Messgrößen

Zudem sind die im laufenden Text und in Abb. 22 (nächste Seite) verwendeten Kennzahlen dargestellt.

Kennzahl	Erfasste Messgröße	Methode
❶	MMP-2-mRNA-Expression	Realtime-PCR
❷	proMMP-2-Konzentration	ELISA
❸ + ❹	Gesamt-MMP-2-Aktivität	spezifischer Aktivitäts-Assay (mit APMA) bzw. Zymographie
❺ + ❻	Aktivität der prozessierten MMP-2	spezifischer Aktivitäts-Assay (ohne APMA) bzw. Zymographie
❼	Total-MMP-Aktivität	unspezifischer Aktivitäts-Assay

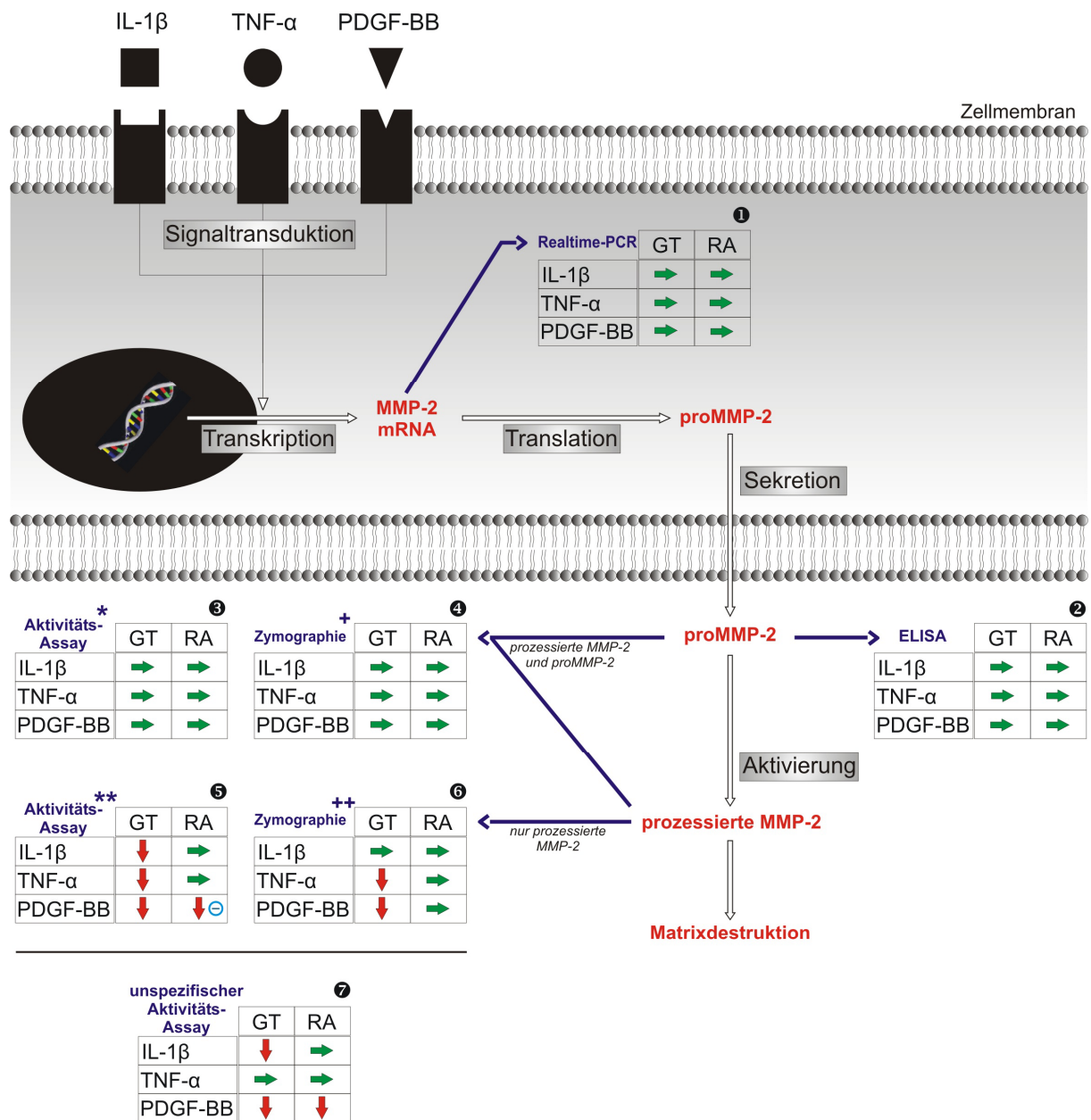


Abb. 22: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse

Dargestellt sind die Ergebnisse der quantifizierenden Analysen an GT- und RA-SFB nach Stimulierung mit IL-1β, TNF-α und PDGF-BB, bei denen die prozentuale Induktion im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS ermittelt wurde (ohne Berücksichtigung der individuellen eingesetzten Konzentrationen).

* Spezifischer Aktivitäts-Assay mit APMA

** Spezifischer Aktivitäts-Assay ohne APMA

+ Zymographie, Addition der densitometrisch ermittelten Intensitäten der Banden bei 72 kDa und 66 kDa

++ Zymographie, densitometrisch ermittelte Intensität der Bande bei 66 kDa alleine

↓ Bei mindestens einer eingesetzten Konzentration signifikant niedriger als 1% FKS.

→ Keine signifikante Veränderung im Vergleich zu 1% FKS.

⊖ RA-SFB bei einer eingesetzten Konzentration signifikant niedriger als GT-SFB.

6. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit ist die erste systematische Untersuchung des Einflusses der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie des Wachstumsfaktors PDGF-BB auf die MMP-2-mRNA-Expression, proMMP-2-Konzentration und MMP-2-Aktivität in kurzpassagierten GT- und RA-SFB. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen die Analyse der MMP-2 zumeist nur durch die Zymographie erfolgte, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein ELISA, ein MMP-2-spezifischer Aktivitäts-Assay sowie die Realtime-PCR eingesetzt. Weiterhin erfolgten Analysen der Total-MMP-Aktivität in einem unspezifischen Aktivitäts-Assay und der TIMP in der Reversen Zymographie.

6.1 Reinheit der verwendeten SFB

Ein sehr hoher Prozentsatz der GT-SFB (> 99%) und der RA-SFB (> 94%) war positiv für den Fibroblastenmarker Prolyl-4-Hydroxylase. Dagegen zeigte sich bei der Analyse des zusätzlich eingesetzten Fibroblastenmarkers CD90 eine signifikant höhere Expression auf GT-SFB (ca. 97%) im Vergleich zu RA-SFB (ca. 62%). Dies lässt auf eine Heterogenität in der Expression von CD90 bei SFB schließen, wie sie bereits für andere Fibroblastenpopulationen beschrieben wurde (Smith et al. 1995). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass GT-SFB am Anfang der 3. Passage, RA-SFB hingegen am Anfang der 2. Passage eingesetzt wurden. Durch die weitere Passagierung der GT-SFB ist eine Selektion bzw. Hochregulierung der Prozentzahl von CD90⁺ SFB möglich (Zimmermann et al. 2001).

Weniger als 2% der GT- und RA-SFB tragen die Monozyten-/Makrophagenmarker CD14 und CD11b. In Vorarbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Kontamination mit T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen und dendritischen Zellen weniger als 1% betrug (Zimmermann et al. 2001). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten GT- und RA-SFB um nahezu reine Fibroblastenpopulationen handelt (Reinheit \geq 98%).

6.2 Vergleichende Analysen von MMP-2 in GT-SFB und RA-SFB bzw. deren Überständen nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB

SFB tragen im Verlauf der RA maßgeblich zur Knorpel- und Knochendestruktion bei. Für eine solche Beteiligung in der RA-SM sprechen ihr aktivierter Phänotyp (Kinne et al. 1995) und ihre Lokalisation an der Knorpel-Pannus-Grenze (Konttinen et al. 1999). Es wurden bereits verschiedene MMP in SFB von RA-Patienten analysiert, jedoch fehlten in der Regel Vergleiche zu SFB von GT-Patienten.

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein umfassendes Profil der MMP-2 in GT-SFB im Vergleich zu RA-SFB ausgearbeitet. Hierzu wurde u. a. die Expression, Proteinkonzentration und Aktivität der MMP-2 in GT- und RA-SFB analysiert. Für diese Untersuchungen wurden SFB verwendet, die sieben Tage nach der Isolierung aus der SM mittels anti-CD14-mAK-gekoppelter Magnetobeads negativ gereinigt wurden, um u. a. kontaminierende Makrophagen zu entfernen (Zimmermann et al. 2001). Diese in unserem Labor etablierte Methode hat den großen Vorteil der kurzen Kultivierungszeit der SFB. Somit stehen diese Zellen dem *in vivo* Phänotyp möglichst nahe (Zimmermann et al. 2001). Infolgedessen werden Kulturartefakte wie die Selektion von Fibroblasten-Subtypen und chromosomal veränderten Zellen sowie Veränderungen im Expressionsprofil einzelner Moleküle minimiert. Bei wiederholt passagierten RA- und OA-SFB wurde bereits eine verminderte Rezeptorexpression für Zytokine wie TNF- α beobachtet (Alsalameh et al. 2003). Laut Firestein (Firestein 1996) sind RA- und OA-SFB nach wiederholten Passagen oftmals sogar funktionell und phänotypisch nicht mehr voneinander zu unterscheiden.

Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie der Wachstumsfaktor PDGF-BB spielen aufgrund ihrer verstärkten Expression in der RA-SM eine bedeutende Rolle (Remmers et al. 1991b, van den Berg und Bresnihan 1999). Für diese drei Substanzen wurde ein starker Einfluss auf die Expression von MMP und TIMP nachgewiesen (Choy und Panayi 2001, DiBattista et al. 1995, Hiraoka et al. 1992, Ries und Petrides 1995). Jedoch fehlten bisher vergleichende Analysen zum differenziellen Einfluss von Zytokinen auf die Expression, Proteinkonzentration und Aktivität von MMP-2 in isolierten GT- und RA-SFB. Dies wird nun mit der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht.

6.2.1 MMP-2-mRNA-Expression in stimulierten GT-SFB und RA-SFB

Sobald Proteinbestimmungen bei Zytokin-stimulierten Zellen durchgeführt werden, sollte ebenso die mRNA-Expression des zu untersuchenden Proteins erfasst werden. Dies ist damit zu begründen, dass durch Zytokinstimulierungen Signaltransduktionskaskaden beeinflusst werden und sich das unmittelbare Ergebnis als erstes auf der Ebene der mRNA-Expression zeigt. Ferner spricht für den Nachweis von mRNA, dass die Synthese eines Proteins ohne vorausgehende mRNA-Expression im Allgemeinen nicht möglich ist, wie es das zentrale Dogma der Mikrobiologie vorschreibt (Crick 1970).

Die Quantifizierung der MMP-2-mRNA-Expression in GT- und RA-SFB, die zuvor mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB stimuliert worden waren, erfolgte mittels Realtime-PCR. In allen Proben der GT- und RA-SFB konnte MMP-2-mRNA detektiert werden, womit die Voraussetzung für eine spätere Translation in MMP-2-Protein erfüllt war. Signifikante Einflüsse der Stimulierungen mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB auf die MMP-2-mRNA-Expression konnten in GT- und RA-SFB nicht beobachtet werden. Gegenwärtig liegen keine Arbeiten anderer Autoren über den Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine oder Wachstumsfaktoren auf die mRNA-Expression in GT- und RA-SFB vor. Es gibt aber übereinstimmende Ergebnisse aus Northern-Hybridisierungen mit Fibroblasten aus der menschlichen Bindehaut, die ebenso keinen Einfluss von IL-1 β oder TNF- α auf die MMP-2-mRNA-Expression zeigten (Meller et al. 2000, Solomon et al. 2000). Von mehreren Autoren wird zudem eine konstitutive Expression der MMP-2-mRNA beschrieben (Borden und Heller 1997, Corcoran et al. 1996, Konttinen et al. 1999, Qin et al. 1998). Sie lässt sich durch die fehlenden Bindungsstellen im Promotor des MMP-2-Gens für Transkriptionsfaktoren wie TRE oder AP-1 erklären (Borden und Heller 1997, Jackson et al. 2001).

Yamanaka et al. (Yamanaka et al. 2000) stellten außerdem in der *in situ* Hybridisierung fest, dass die mRNA von MMP-2, TIMP-2 und MMP-14 in der Deckzellschicht der RA-SM kolokalisiert ist. Eine Arbeit von Goldbach-Mansky et al. (Goldbach-Mansky et al. 2000) bestätigte dies, und Konttinen et al. (Konttinen et al. 1998) zeigten diese Kolokalisation in der RA ebenso an der Knorpel-Pannus-Grenze. Die drei genannten Enzyme bilden den trimolekularen Komplex, der proMMP-2 prozessiert und somit aktiviert (Abb. 9, S. 35). Somit konnte an den Stellen mit erhöhter gelatinolytischer Aktivitätsverteilung in der RA-SM (Yamanaka et al. 2000) die mRNA-Expression der Enzyme nachgewiesen werden, die für die Prozessierung von proMMP-2 erforderlich sind. Dies unterstreicht die Hypothese der Prozessierung von

proMMP-2 im trimolekularen Komplex sowie der hierdurch lokal regulierbaren MMP-2-Aktivität.

Die Halbwertszeit der MMP-2-mRNA in kurz-passagierten, humanen Fibroblasten wird von Overall et al. (Overall et al. 1991) mit ca. 46 Stunden angegeben. Die Expression der MMP-2-mRNA kann jedoch innerhalb von 24 Stunden starken Schwankungen unterliegen. So kann sie nach 7-stündiger Stimulierung mit TGF- β um ein Vielfaches der Ausgangsmenge ansteigen und bereits nach 24-stündiger Stimulierung mit TGF- β auf das Kontrollniveau zurückfallen (Overall et al. 1991). Hierbei wird eine Kontrolle der mRNA-Degradation im Allgemeinen nicht als Mechanismus der MMP-Regulation angesehen (Overall et al. 1991). Qin et al. (Qin et al. 1998) zeigten in humanen Astrogliazellen, dass die konstitutiv exprimierte MMP-2-mRNA auch unter Zytokineinflüssen sehr stabil ist und über die beobachteten 12 Stunden keinen wesentlichen Degradationsvorgängen unterliegt. Somit scheint die MMP-2 nicht (post-)transkriptional, sondern vielmehr posttranslational reguliert zu werden (Goldbach-Mansky et al. 2000, Overall et al. 1991, Qin et al. 1998, Ries und Petrides 1995). Zusammen mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen, die eine durch Zytokinstimulationen unbeeinflusste MMP-2-mRNA-Expression demonstrieren, spricht dies dafür, dass die Regulierung der MMP-2-mRNA in der RA keinen geeigneten Angriffspunkt für therapeutische Maßnahmen darstellt.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass auch eine Unterscheidung zwischen proMMP-2 und prozessierter MMP-2 in der PCR nicht möglich ist (Tolboom et al. 2002). Außerdem lässt die zu einem bestimmten Zeitpunkt durchgeführte mRNA-Quantifizierung keine Aussage bzgl. der mRNA-Stabilität, des später sezernierten Proteins oder dessen Aktivität zu (Bustin 2002, Gygi et al. 1999, Tolboom et al. 2002). Neueste Erkenntnisse hierzu lieferte kürzlich unsere Arbeitsgruppe (Huber et al. 2005), in denen sie eine beträchtliche Abweichung der mRNA-Expression von Proto-Onkogenen zu deren Proteinkonzentration in der RA-SM beschrieb. Allerdings wurde in Gingiva- und synovialen Fibroblasten von engen Korrelationen zwischen der MMP-2-mRNA-Expression und der MMP-2-Sekretion berichtet (Overall et al. 1991, Tolboom et al. 2002). Dies stellt erneut kein Argument für eine instabile MMP-mRNA (s. o.) dar, und es ist somit von einer stabilen MMP-2-mRNA auszugehen.

In dieser Arbeit wurde die Realtime-PCR anstelle der konventionellen PCR eingesetzt, weil sie sich in den Punkten Präzision, Reproduzierbarkeit sowie Arbeits- und Zeitaufwand als

überlegen erwiesen hat (Huber et al. 2003). Bustin et al. (Bustin 2000) vertreten sogar den Standpunkt, dass die Realtime-PCR für die sensitive, spezifische und reproduzierbare mRNA-Quantifizierung als Methode der Wahl angesehen werden muss.

Ein in der Literatur kontrovers diskutierter Aspekt der quantitativen Realtime-PCR ist die Verwendung eines geeigneten Housekeeping-Gens für die Normalisierung der Messwerte. Einige Autoren beschrieben nach Zytokinstimulationen eine veränderte Expression des GAPDH-Gens und sprachen sich gegen die Verwendung des GAPDH-Gens bzw. gänzlich gegen die Verwendung von Housekeeping-Genen aus. Es wurde folglich empfohlen, für die Quantifizierung der mRNA-Expression andere Housekeeping-Gene einzusetzen bzw. eine Normalisierung auf die eingesetzte Zellzahl durchzuführen (Bustin 2002, Schmittgen und Zakrajsek 2000, Tricarico et al. 2002). Auf der anderen Seite ist das GAPDH-Gen nach wie vor eines der gebräuchlichsten Housekeeping-Gene und wird wie in dieser Arbeit üblicherweise auch für Bestimmungen in GT- und RA-SFB eingesetzt (Franz et al. 2000, Ogura et al. 2005, Yamanishi et al. 2002b, Zeisel et al. 2005).

6.2.2 ProMMP-2-Konzentration in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB

Die umfassende Charakterisierung einer Proteinase gelingt nicht durch die alleinige Analyse der mRNA-Expression, sondern erfordert weiterhin die Erfassung der Proteinkonzentration und (wenn zutreffend) ihrer enzymatischen Aktivität. Der spezifische Nachweis der MMP-2 wurde mittels Western-Blots erbracht (siehe 5.4.1, S. 64). Für die Bestimmung der proMMP-2-Konzentration aus den Überständen der mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB stimulierten GT- bzw. RA-SFB wurde ein kommerzielles ELISA-System der Firma Amersham Biosciences eingesetzt.

In den Überständen der unstimulierten GT- und RA-SFB konnten nach 24 Stunden proMMP-2-Konzentrationen von durchschnittlich 0.55 bzw. 0.53 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden (Tab. 8, S. 76). Diese Beobachtungen stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Messungen in der RA- und OA-SF überein (0.5 bis 0.6 $\mu\text{g/ml}$; Buisson-Legendre et al. 2004) und übertreffen die in der RA und in nicht-rheumatoiden Arthritisformen gefundenen Serumwerte um das 5- bis 6-fache (ca. 0.1 $\mu\text{g/ml}$; Goldbach-Mansky et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die proMMP-2-Sekretion aus GT- und RA-SFB erstmals mittels ELISA bestimmt. Aus Endometriumzellen beschrieben Sillem et al. (Sillem et al. 2001) unter Einsatz eines

ELISA eine proMMP-2-Sekretion von ca. 0.2 µg/ml. Somit sind GT- und RA-SFB *in vitro* zu einer ca. 2.5-fach höheren MMP-2-Sekretion als Endometriumzellen befähigt.

Unstimulierte GT-, RA- und OA-SFB sezernieren im Vergleich zu anderen MMP (z. B. MMP-1, MMP-3) sehr hohe MMP-2-Spiegel (Alsalamah et al. 2003, Fuchs et al. 2004, Westra et al. 2004). So wurden für die MMP-1-Sekretion aus unstimulierten RA- und OA-SFB Konzentrationen von ca. 25 ng/ml gemessen (Alsalamah et al. 2003, Fuchs et al. 2004, Westra et al. 2004). Unstimulierte OA-SFB sezernieren niedrige Spiegel von MMP-3 in den Überstand (ca. 10 ng/ml), während MMP-13 überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte (Fuchs et al. 2004). Hingegen wird laut der vorliegenden Arbeit von GT- und RA-SFB mit ca. 545 ng/ml bzw. ca. 535 ng/ml (Tab. 8, S. 76) weit mehr MMP-2 in den Überstand sezerniert. Die Sekretion von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 erhöht sich im Gegensatz zur MMP-2 nach Stimulierung der SFB mit pro-inflammatorischen Zytokinen jedoch deutlich (Alsalamah et al. 2003, Fuchs et al. 2004, Migita et al. 2004, Westra et al. 2004). Beispielsweise kann die MMP-1-Sekretion von ca. 25 ng/ml aus unstimulierten RA-SFB auf 1 900 ng/ml aus mit TNF- α -stimulierten RA-SFB ansteigen und somit das 4-fache der MMP-2-Sekretion betragen (Alsalamah et al. 2003). Dies deutet auf eine mögliche Bedeutung dieser MMP (MMP-1, MMP-3 und MMP-13) im Synovialgewebe bei der RA *in vivo* hin.

In unseren Untersuchungen fand sich keine signifikante Beeinflussung der proMMP-2-Konzentration nach Stimulierung der GT- und RA-SFB mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB. Dieser fehlende Einfluss von IL-1 β auf die MMP-2-Konzentration in den Überständen von RA-SFB wurde ebenso von anderen Autoren beschrieben (Migita et al. 2004, Tetlow und Woolley 1999). Auch die im Western-Blot bestimmte MMP-2-Sekretion von Fibroblasten aus der Konjunktiva sowie aus dem Pterygium wird durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren nicht beeinflusst (Meller et al. 2000, Solomon et al. 2000). In Versuchen mit Melanom-Zellen konnte durch TNF- α ebenso keine gesteigerte proMMP-2-Sekretion detektiert werden (Katerinaki et al. 2003). Dagegen beschrieben Martin-Chouly et al. (Martin-Chouly et al. 2004) eine erhöhte proMMP-2-Sekretion aus mit TNF- α (10 ng/ml) stimulierten Lungenfibroblasten im ELISA. Hiraoka et al. (Hiraoka et al. 1992) stimulierten GT- und RA-SFB mit 10 U/ml PDGF-BB und konnten danach im Western-Blot keine signifikanten Veränderungen der proMMP-2-Sekretion feststellen. Hierbei wurden jedoch SFB bis zur 7. Passage verwendet. Unsere Daten liefern nun übereinstimmende Ergebnisse in kurz-passagierten GT- und RA-SFB (3. bzw. 2. Passage) und lassen somit Aussagen zu, die eher dem *in vivo* Phänotyp entsprechen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen der in der Literatur beschriebenen, konstitutiven MMP-2-Sekretion aus SFB (Goldbach-Mansky et al. 2000, Hiraoka et al. 1992, Migita et al. 1996, Okada et al. 1990). Folglich scheint die matrixdegradierende Wirkung der MMP-2 nicht durch eine veränderte proMMP-2-Sekretion aus SFB reguliert zu werden.

Der eingesetzte ELISA detektiert neben der freien proMMP-2 auch die an TIMP-gebundenen proMMP-2-Formen (siehe Abb. 10, S. 43). Durch die spezifische Bindung des im ELISA verwendeten Antikörpers an Epitope des MMP-2-Propeptides werden prozessierte MMP-2-Formen *nicht* erfasst. Die Ergebnisse der Zymographie zeigen dabei, dass die potenzielle Aktivität der proMMP-2-Formen in unstimulierten GT- und RA-SFB (Mediumkontrolle/1% FKS) durchschnittlich 15- bis 16-fach höher liegt als die Aktivität der prozessierten MMP-2-Formen, deren Anteil an der Gesamt-MMP-2-Aktivität somit bei ca. 6% liegt (Daten nicht gezeigt). Folglich erfasst der ELISA mit den proMMP-2-Formen die mit Abstand größte Fraktion aller MMP-2-Formen.

6.2.3 MMP-2-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB

Um die MMP-2 eingehend zu beschreiben, sind die bisher besprochenen Quantifizierungen und möglichen Beeinflussungen durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren auf der Ebene der Genexpression bzw. der nachfolgenden Proteinsekretion aus der Zelle von großer Bedeutung. Dennoch bestimmt letztlich die Aktivität einer Proteinase *in vivo* deren physiologisches Wirkprofil. Dabei muss diese *in vivo* Aktivität von den *in vitro* beobachteten Ergebnissen der Aktivitätsbestimmungen klar getrennt werden. *In vivo* ist lediglich die prozessierte MMP-2 physiologisch aktiv und dies auch nur unter der Voraussetzung, dass nicht ausreichend Inhibitoren wie die TIMP vorhanden sind, um die freie prozessierte MMP-2 zu binden und somit zu inaktivieren. *In vitro* hingegen können ursprünglich inaktive MMP-2-Formen durch den Einsatz von Stoffen wie APMA oder SDS, die *in vivo* nicht vorkommen, in ihren aktiven Zustand überführt werden. Solche Stoffe finden bei *in vitro* Versuchen häufig Verwendung, besonders wenn eine Aussage über das potenzielle Ausmaß einer Meßgröße - z. B. „maximal mögliche MMP-2-Aktivität“ - getroffen werden soll. Begründen lässt sich diese Vorgehensweise bei *in vitro* Untersuchungen mit isolierten SFB durch den fehlenden Stimulus des *in vivo* vorliegenden Milieus. Dieses Milieu zeichnet sich u. a. durch Zell-Zell-Kontakte, weitere prozessierende Enzyme (auch von anderen Zellen) sowie ein sehr umfangreiches Zytokinnetzwerk unter

den Zellen aus und bewirkt somit *in vivo* eine multifaktoriell und differenziert abgestimmte Beeinflussung der SFB (Cawston 1998, Konttinen et al. 2000, McInnes et al. 2000, Pap et al. 2000c).

Die *in vitro* Bestimmungen der MMP-2-Aktivität in den Überständen von mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB stimulierten GT- und RA-SFB erfolgten mittels eines spezifischen Aktivitäts-Assay-Systems der Firma Amersham Biosciences und mittels Zymographie. Angesichts der komplexen Diskussion der detektierten MMP-2-Aktivitäten durch die unterschiedlichen Methoden sei als Hilfestellung an Abb. 10 (S. 43), Tab. 10 (S. 81) und Abb. 22 (S. 82) erinnert. Im spezifischen Aktivitäts-Assay (Methodik siehe 4.6.1, S. 55) und in der Zymographie (Methodik siehe 4.6.2, S. 56) wurden jeweils zwei Aktivitätsbestimmungen durchgeführt: die Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität (bestehend aus der Aktivität der proMMP-2 und der prozessierten MMP-2) sowie die Bestimmung der alleinigen Aktivität der prozessierten MMP-2. Im Folgenden wird der Begriff „Gesamt-MMP-2-Aktivität“ wie soeben erklärt verwendet (siehe auch Tab. 10, S. 81 und Abb. 22, S. 82). Es muss hierbei hervorgehoben werden, dass die beiden verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Gesamt-MMP-2-Aktivität und der Aktivität der prozessierten MMP-2 jeweils unterschiedliche Entitäten erfassen. So detektiert die Zymographie im Vergleich zum spezifischen Aktivitäts-Assay neben den freien MMP-2-Formen (freie proMMP-2 bzw. freie prozessierte MMP-2) auch die übrigen, TIMP-gebundenen MMP-2-Formen (siehe Abb. 10, S. 43). In der Zymographie stellt dabei die Addition der beiden MMP-2-Banden (proMMP-2 und prozessierte MMP-2 bei 72 bzw. 66 kDa) eine übliche Methode zur Bestimmung der potenziellen Gesamt-MMP-2-Aktivität dar (Yamanaka et al. 2000). Im spezifischen Aktivitäts-Assay dagegen werden die TIMP-gebundenen MMP-2-Formen durch APMA nicht aktiviert und bleiben daher proteolytisch inaktiv. Die Zymographie beschreibt also die potenziellen Aktivitäten der freien *und* TIMP-gebundenen MMP-2-Formen, während sich der spezifische Aktivitäts-Assay auf die Aktivitäten der freien MMP-2-Formen beschränkt (Capper et al. 1999, Miyazaki et al. 1992). Daher liefern die beiden Methoden in Abhängigkeit vom Ausmaß der TIMP-gebundenen MMP-2-Formen unterschiedliche Ergebnisse.

6.2.3.1 Gesamt-MMP-2-Aktivität

Trotz der genannten Unterschiede zeigten beide Methoden übereinstimmend keine signifikante Beeinflussung der Gesamt-MMP-2-Aktivität nach Stimulierung der GT- und RA-SFB mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS. Dies bedeutet, dass die potenzielle Gesamt-MMP-2-Aktivität in GT- sowie RA-SFB durch die eingesetzten Stimuli nicht beeinflusst wird.

Zur Darstellung der Gesamt-MMP-2-Aktivität von Zytokin-stimulierten SFB sind bisher keine Untersuchungen bekannt. Die Ergebnisse der Zymographie zeigen, dass die proMMP-2-Formen mit einer 15- bis 16-fach höheren Aktivität als die prozessierten MMP-2-Formen den größten Anteil der Gesamt-MMP-2-Aktivität bei unstimulierten GT- und RA-SFB stellen (Mediumkontrolle/1% FKS; Daten nicht gezeigt). Dabei wies die Zymographie keinen Einfluss der eingesetzten Zytokinstimulierungen auf die Gesamt-MMP-2-Aktivität nach. Übereinstimmend wurde im ELISA auf Proteinebene keine Beeinflussung der Zytokinstimulierungen auf die Konzentration der proMMP-2 detektiert (Abb. 13, S. 65).

Der Vergleich zwischen GT-SFB und RA-SFB ergab sowohl im spezifischen Aktivitäts-Assay als auch in der Zymographie keinen Unterschied bzgl. der Zytokineinflüsse. Dagegen wurde in Homogenaten der RA-SM im Vergleich zur GT-SM eine 5- bis 8-fach höhere Aktivität der proMMP-2 (prädominante MMP-2-Form) beschrieben (Yamanaka et al. 2000). Dies könnte auf *in vivo* bzw. in der SM vorliegende Signale durch z. B. Zell-Zell-Kontakte, weitere prozessierende Enzyme (auch von anderen Zellen) oder ein komplexeres Zytokinnetzwerk (Cawston 1998, Konttinen et al. 2000, McInnes et al. 2000, Pap et al. 2000c) zurückzuführen sein, die *in vitro* bei isolierten SFB fehlen. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen der Gesamt-MMP-2-Aktivität zeigten Han et al. (Han et al. 2001) in der Zymographie, dass TNF- α bei isolierten Haut-Fibroblasten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der proMMP-2 (prädominante 72 kDa Bande) hat. Jedoch schilderten Martin-Chouly et al. (Martin-Chouly et al. 2004) in der Zymographie eine durch TNF- α erhöhte Aktivität der proMMP-2 bei Lungenfibroblasten. Es ist folglich durchaus möglich, dass Fibroblastenpopulationen aus verschiedenen Organen unterschiedlich auf Zytokineinflüsse reagieren.

6.2.3.2 Aktivität der prozessierten MMP-2

Bei den Aktivitätsbestimmungen der prozessierten MMP-2 in den Überständen der mit IL-1 β , TNF- α oder PDGF-BB stimulierten GT- und RA-SFB zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede im spezifischen Aktivitäts-Assay sowie in der Zymographie. Die Ergebnisse sind nach Stimulierung im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS dargestellt.

Spezifischer Aktivitäts-Assay (ohne APMA)

Im spezifischen Aktivitäts-Assay wurde ohne Einsatz von APMA die Aktivität der in den Überständen freien prozessierten MMP-2 bestimmt (Tab. 10, S. 81 und Abb. 22, S. 82). Es zeigte sich bei GT-SFB eine signifikante Verminderung der Aktivität der prozessierten MMP-2 nach Stimulierung mit IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB. Bei RA-SFB blieb die Aktivität der prozessierten MMP-2 nach Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α unbeeinflusst, wohingegen PDGF-BB die Aktivität der prozessierten MMP-2 in GT-SFB *und* in RA-SFB verringerte. Dabei verminderte PDGF-BB bei RA-SFB die Aktivität der prozessierten MMP-2 zugleich signifikant stärker als bei GT-SFB (jeweils im Vergleich zur Mediumkontrolle/1% FKS).

Die Aktivität der prozessierten MMP-2 wird also in GT-SFB durch IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB vermindert, wohingegen dies in RA-SFB nur noch durch PDGF-BB möglich ist. Dies bedeutet, dass der regulatorische Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf RA-SFB fehlt. Angesichts des beträchtlichen Degradationspotenzials der prozessierten und somit proteolytisch aktiven MMP-2 stellt diese Resistenz der RA-SFB gegenüber dem gewebsprotektiven Einfluss von IL-1 β und TNF- α eine ernstzunehmende Bedrohung für die EZM dar. Noch kritischer erscheint diese Situation in Anbetracht der Annahme, dass prozessierte MMP-2 in der SM mit einer funktionstüchtigen Regulation normalerweise vollständig durch TIMP inhibiert wird (Ratnikov et al. 2002, Yamanaka et al. 2000). Dennoch detektierte der spezifische Aktivitäts-Assay in der vorliegenden Arbeit *freie* (und somit TIMP-*ungebundene*) prozessierte MMP-2 (siehe 4.6.1, S. 55). Daher lassen diese *in vitro* Ergebnisse vermuten, dass das Synovialgewebe in der RA vollkommen ungeschützt der hochpotenten matrixdegradierenden Wirkung der prozessierten MMP-2 ausgesetzt ist und die Knorpel- und Knochendestruktion weiter voranschreitet.

Entsprechende Untersuchungen zur MMP-2-Aktivität in GT- und RA-SFB mittels eines spezifischen Aktivitäts-Assays fehlen bislang in der Literatur. Dass TNF- α die Prozessierung der proMMP-2 jedoch inhibieren kann, wurde bereits in Plasmamembranen von Astrogliazellen im Western-Blot gezeigt (Qin et al. 1998).

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α in normalen SFB (GT-SFB) die Prozessierung der proMMP-2 zu inhibieren und somit dem Abbau von Matrixbestandteilen entgegenzuwirken. Obwohl in diesem System noch nicht untersucht, sind theoretisch folgende Mechanismen denkbar.

Zum einen könnte die MMP-14 eine Rolle spielen, die an der Prozessierung der proMMP-2 maßgeblich beteiligt ist (Abb. 9, S. 35) und deren mRNA-Expression in der RA-SM direkt mit der Prozessierung der proMMP-2 korreliert (Yamanaka et al. 2000). So wäre durch IL-1 β bzw. TNF- α eine Inhibierung aktiver MMP-14 bzw. der Synthese von MMP-14 denkbar, wodurch an der Zelloberfläche weniger prozessierte und somit proteolytisch aktive MMP-2 aus dem trimolekularen Komplex (proMMP-2/TIMP-2/MMP-14-Komplex) freigesetzt werden würde (Ellerbroek und Stack 1999). Allerdings wurde in RA-SFB eine durch IL-1 β induzierbare MMP-14-mRNA-Expression (Honda et al. 2001) und eine durch TNF- α induzierbare Aktivierung der MMP-14 beschrieben (Migita et al. 1996), die eher zu einer vermehrten Prozessierung von proMMP-2 führen dürften. Daher sind die vorliegenden Ergebnisse wahrscheinlich nicht auf diesen Mechanismus zurückzuführen.

Weiterhin wurde kürzlich beschrieben, dass die MMP-14-Aktivität durch Glykosilierung moduliert zu werden scheint. In Abhängigkeit von der Glykosilierung der MMP-14 verändert sich nach diesem Modell das Bindungsverhalten für TIMP-2, der im trimolekularen Komplex an der Zelloberfläche für die Prozessierung von proMMP-2 notwendig ist (Wu et al. 2004). Bisher liegen keine Daten zum Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf die Glykosilierung von MMP-14 vor. Doch ist es zumindest theoretisch möglich, dass IL-1 β und TNF- α die Prozessierung von proMMP-2 über eine modifizierte Glykosilierung von MMP-14 vermindern könnten.

Eine andere Möglichkeit stellt eine durch IL-1 β bzw. TNF- α vermittelte Stimulierung der Synthese von TIMP-2 dar, die zu einem veränderten Gleichgewicht von TIMP-2 zu MMP-14 bzw. TIMP-2 zu prozessierter MMP-2 führen. Hohe TIMP-2-Konzentrationen inhibieren freie MMP-14, die für die Prozessierung der proMMP-2 im trimolekularen Komplex notwendig ist (Sounni et al. 2003; siehe Abb. 9, S. 35). Daneben inhibieren hohe Konzentrationen von TIMP die prozessierte MMP-2 auch direkt in der EZM (Brew et al. 2000). Somit können hohe TIMP-2-Spiegel die Aktivität der prozessierten MMP-2 auf zwei unterschiedlichen Wegen hemmen (Bernardo und Fridman 2003, Fassina et al. 2000). In anderen MMP/TIMP-Systemen wurden in der RA bereits Gleichgewichtsverschiebungen gezeigt. Alsalamah et al. (Alsalamah et al. 2003) beschrieben nach Stimulierung mit TNF- α ein signifikant höheres MMP-1/TIMP-1-Verhältnis bei RA-SFB im Vergleich zu OA-SFB. Fuchs et al. (Fuchs et al.

2004) wiesen bei OA-SFB nach gleichzeitiger Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α eine starke Erhöhung des MMP-3/TIMP-1-Verhältnisses nach. Goldbach-Mansky et al. (Goldbach-Mansky et al. 2000) zeigten mittels Immunohistologie in der RA-SM eine höhere Expression der MMP-14-mRNA und eine niedrigere Expression der TIMP-2-mRNA verglichen mit der SM von nicht-rheumatoiden Arthritiden. Möglicherweise ist das MMP-14/TIMP-2-Verhältnis auch auf Proteinebene zugunsten der MMP-14 verändert und könnte so für die vergleichsweise höhere Prozessierung von proMMP-2 in der RA verantwortlich sein. Schließlich wird angenommen, dass proMMP-2 durch MMP-14 am effektivsten bei einer im Vergleich zu MMP-14 niedrigeren Konzentration von TIMP-2 prozessiert wird (Sounni et al. 2003; siehe 2.3.4.2, S. 33). Inwieweit IL-1 β und TNF- α die Proteinkonzentration von TIMP-2 in SFB beeinflussen und dabei das MMP-2/TIMP-2- bzw. MMP-14/TIMP-2-Verhältnis verändern, wurde bisher allerdings noch nicht untersucht. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass MMP-14 auch in den Überständen von RA-SFB vorliegt und somit weitergehende Versuche erstrebenswert sind (unveröffentlichte Daten).

Darüber hinaus könnten veränderte Signaltransduktionen von IL-1 β bzw. TNF- α in den SFB von RA-Patienten dazu geführt haben, dass Regulationsmechanismen fehlen und die RA-SFB unter dem Einfluss dieser Zytokine nicht mehr in der Lage sind, mit einer verminderten Aktivität der prozessierten MMP-2 zu reagieren. Ob dies auf Veränderungen der Rezeptorexpression oder Rezeptoraffinität, auf Ebene der Zytokinbindung (z. B. veränderte Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor aufgrund Sauerstoffradikalen oder Zytokinen) oder auf Ebene der Signaltransduktion (z. B. veränderte intrazelluläre Signaltransduktionen von NF- κ B oder AP-1) von IL-1 β bzw. TNF- α beruht, bleibt noch zu klären. In Haut- bzw. Herz-Fibroblasten konnte durch IL-1 β bzw. TNF- α bereits eine Aktivierung des Signalweges von NF- κ B nachgewiesen werden, der für die Induktion von MMP-14 von Bedeutung ist (Han et al. 2001, Xie et al. 2004).

Zusammengefasst ist also eine Reihe verschiedener Untersuchungen erforderlich, um die kausalen Mechanismen für diese neu entdeckte Resistenz der RA-SFB gegenüber der gewebsschutzenden Wirkung von IL-1 β und TNF- α zu identifizieren.

Auf Stimulierung mit PDGF-BB reagierten sowohl die GT-SFB als auch die RA-SFB mit einer verminderten Aktivität der prozessierten MMP-2. Somit scheint PDGF-BB über Modulation der MMP-2-Aktivität einen gewebsschutzenden Beitrag in der RA zu leisten. Auch diese Angaben sind in der Literatur neu. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der gewebsschutzende Einfluss von PDGF-BB bei den RA-SFB sogar stärker ausgeprägt. Dies kann daran lie-

gen, dass auf den SFB von RA-Patienten (insbesondere in der Deckzellschicht) eine verstärkte Expression der PDGF-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (Rubin et al. 1988). Die RA-SFB zeigen also eine intakte physiologische Ansprechbarkeit auf PDGF-BB. Diese Tatsache könnte möglicherweise therapeutisch genutzt werden. Jedoch ist zunächst eine Reihe weiterer Untersuchungen erforderlich, um die kausale PDGF-Isoform bzw. PDGF-Rezeptorkette zu bestimmen. Im Anschluss daran sind als klinischer Ausblick dieser Ergebnisse *in vivo* Versuche z. B. mit einem entsprechenden PDGF-Analogen denkbar, um die durch prozessierte MMP-2 verursachte Gewebsdestruktion zu minimieren.

Zymographie (66 kDa Bande)

In der Zymographie wurde mit der 66 kDa Bande die Aktivität der freien *und* TIMP-gebundenen prozessierten MMP-2 erfasst (Tab. 10, S. 81 und Abb. 22, S. 82). Dabei blieb die Aktivität dieser prozessierten MMP-2-Formen nach Stimulierung mit IL-1 β bei GT- und RA-SFB unbeeinflusst. TNF- α und PDGF-BB verminderten signifikant die Aktivität der prozessierten MMP-2-Formen bei GT-SFB, nicht jedoch bei RA-SFB.

Die vorliegenden Ergebnisse sowohl der Zymographie als auch des spezifischen Aktivitäts-Assays bekräftigen die Hypothese eines gewebsprotektiven Effekts durch TNF- α in GT-SFB, der in RA-SFB aufgehoben zu sein scheint.

Die im Vergleich zum spezifischen Aktivitäts-Assay unterschiedlichen Ergebnisse in der Zymographie (nach Stimulierung mit IL-1 β bei GT-SFB und nach Stimulierung mit PDGF-BB bei RA-SFB) beruhen darauf, dass die Zymographie auch die TIMP-gebundenen MMP-2-Formen detektiert. Diese differenten Ergebnisse lassen auf eine vergleichsweise höhere Menge von TIMP-gebundener prozessierter MMP-2 schließen, die in der Zymographie (aber nicht im spezifischen Aktivitäts-Assay) neben der freien prozessierten MMP-2 detektiert wird. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist allerdings unklar und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Honda et al. (Honda et al. 2001) beschrieben bei isolierten RA-SFB nach Stimulierung mit IL-1 β eine erhöhte Aktivität der prozessierten MMP-2 in der Zymographie. Hierfür wurden wie in der vorliegenden Arbeit kurz-passagierte Zellen eingesetzt. Allerdings waren diese Zellen mit einer Dauer von 48 h einem wesentlich längeren Zytokineinfluss ausgesetzt, wodurch die abweichenden Ergebnisse erklärbar wären. Dagegen zeigten in der Zymographie den vorliegenden Ergebnissen entsprechend Hecker-Kia et al. (Hecker-Kia et al. 1997) bei RA-SFB nach 24-stündiger Stimulierung mit IL-1 β lediglich geringe Effekte auf die Aktivität

der prozessierten MMP-2 und Katerinaki et al. (Katerinaki et al. 2003) bei TNF- α -stimulierten Melanomzellen keine erhöhte Aktivität der prozessierten MMP-2.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil der Aktivität der prozessierten MMP-2 an der Gesamt-MMP-2-Aktivität in der Zymographie mit durchschnittlich 6.1% und 6.0% in unstimulierten GT- bzw. RA-SFB bestimmt (Mediumkontrolle/1% FKS; Daten nicht gezeigt). Dagegen beschrieben Yamanaka et al. (Yamanaka et al. 2000) in der Zymographie mit Anteilen von ca. 15% in der GT-SM, ca. 40% in der RA-SM und ca. 25% in der OA-SM deutlich höhere Werte. Dass die aus der SM isolierten SFB jedoch potenziell durchaus zu vielfach höheren Spiegeln der prozessierten MMP-2 in der Lage sind, ist aufgrund der hohen proMMP-2-Spiegel von 0.55 bzw. 0.53 $\mu\text{g/ml}$ (GT-SFB bzw. RA-SFB; Mediumkontrolle/1% FKS;

ELISA; Tab. 8, S. 76) und der 15- bis 16-fach höheren potenziellen Gesamt-MMP-2-Aktivität im Vergleich zur Aktivität der prozessierten MMP-2 alleine anzunehmen (Mediumkontrolle/1% FKS; Zymographie; Daten nicht gezeigt). Die isolierten SFB produzieren folglich genügend inaktive proMMP-2 als Speicherform, die durch bestimmte Signale *in vivo* bzw. in der SM prozessiert und dadurch aktiviert werden könnten. Somit beruhen die niedrigeren Werte in der vorliegenden Arbeit möglicherweise auf dem Fehlen von Prozessierungsmechanismen, die hingegen in der SM (bei Yamanaka et al. 2000) aufgrund von Zell-Zell-Kontakten, weiteren prozessierenden Enzymen (auch von anderen Zellen) sowie umfassenderen Zytokinnetzwerken vorhanden sind (Cawston 1998, Konttinen et al. 2000, McInnes et al. 2000, Pap et al. 2000c). Weiterhin könnten die unterschiedlichen Ergebnisse darauf zurückzuführen sein, dass Yamanaka et al. SM ohne Kultivierung verwendeten, wohingegen bei unseren Untersuchungen GT- und RA-SFB nach der 3. bzw. 2. Passage eingesetzt wurden.

Jedoch setzten auch Yamanaka et al. die Zymographie als Detektionsmethode der MMP-2-Aktivität ein, weshalb die Frage nach der *freien* und somit aktiven prozessierten MMP-2 nicht beantwortet werden konnte. Weiterhin wurden bei den Untersuchungen von Yamanaka et al. *keine* Stimulationsversuche mit Zytokinen durchgeführt. Aufschlussreich wären in diesem Zusammenhang differenzierte Untersuchungen der TIMP-gebundenen MMP-2-Formen (proMMP-2, prozessierte MMP-2). Eine Möglichkeit zur differenzierten Betrachtung der TIMP-gebundenen MMP-2-Formen stellt die sequenzielle Immunopräzipitation dar, mit der diese Formen mittels im Überschuss eingesetzter spezifischer Antikörper aus einem Zelllysats isoliert werden können. Diese Fragestellung war allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit. Zudem können hierzu aus den Ergebnissen des spezifischen Aktivitäts-Assays und der

Zymographie keine vergleichenden Aussagen getroffen werden, da diese beiden Methoden unterschiedliche MMP-2-Formen erfassen.

Weiterhin lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese zu, dass die proteolytische Aktivität der MMP-2 in der SM posttranslational und lokal reguliert wird. Diese Annahme basiert zum einen auf die durch die Zytokinstimulierungen *unbeeinflusste* MMP-2-mRNA-Expression, proMMP-2-Konzentration sowie Gesamt-MMP-2-Aktivität und zum anderen auf die durch die Zytokinstimulierungen *beeinflussbare* Aktivität der prozessierten MMP-2 (siehe Abb. 22, S. 82). Weitere Anhaltspunkte für diese Hypothese finden sich in Arbeiten anderer Autoren. Yamanaka et al. (Yamanaka et al. 2000) zeigten mittels *in situ* Zymographie gelatinolytische Aktivität in der RA-SM nach 4 h nur in der Deckzellschicht und nach 12 h ebenso in tiefer gelegenen Schichten der SM. Dagegen wies die GT-SM keine gelatinolytische Aktivität auf. Dabei stimmte die gelatinolytische Aktivitätsverteilung in der Deckzellschicht der RA-SM mit der Immunolokalisation von MMP-2, MMP-14 und TIMP-2 überein (Yamanaka et al. 2000). Yamanaka et al. schlussfolgerten, dass diese Aktivität vorrangig von der durch MMP-14 prozessierten MMP-2 stammte. Dass die tiefer liegenden Schichten der SM bereits deutlich weniger gelatinolytische Aktivität aufweisen, lässt auf eine Kontrolle und Regulation der MMP-2 durch die Lokalisation der am trimolekularen Komplex beteiligten Proteine schließen. Somit deuten die Ergebnisse von Yamanaka et al. darauf hin, dass MMP-14 und TIMP-2 in der RA-SM lokal vorhanden sind und proMMP-2 dadurch nur an diesen Stellen im trimolekularen Komplex prozessiert werden kann. Andernfalls liegt die prozessierte MMP-2 (durch TIMP) komplett inhibiert vor (Ratnikov et al. 2002).

Die Hypothese wird auch durch eine Arbeit von Schutz et al. (Schutz et al. 2002) gestützt, die prozessierte MMP-2 lediglich in nächster Umgebung von Fibroblasten in Lungenkarzinomen detektieren konnten, wohingegen normale Epithelzellen der Lunge keine prozessierte MMP-2 freisetzen. Einen weiteren Hinweis lieferten kürzlich Lu et al. (Lu et al. 2004), die bei Arthritis-Patienten in erkrankten, hypertrophierten SM-Arealen eine höhere Aktivität der prozessierten MMP-2 detektierten als in angrenzenden, histologisch unveränderten SM-Regionen.

Folglich stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Angaben in der Literatur überein und bekräftigen die posttranslationale, lokale Regulation der proteolytischen Aktivität der MMP-2.

6.2.4 Total-MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten GT-SFB und RA-SFB

Zur Bestimmung der sog. Total-MMP-Aktivität wurde das synthetische Substratpeptid Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ eingesetzt (siehe 4.6.3, S. 57; Knight et al. 1992). Dieses Substrat weist für die *in situ* Detektion der MMP-Aktivität eine sehr hohe Sensitivität auf (Schurigt et al. 2005). Dem Assay wurde APMA hinzugefügt, um die freien Formen sowohl der proMMP-2 als auch der prozessierten MMP zu erfassen.

Dabei zeigte sich bei Betrachtung der Absolutwerte kein signifikanter Unterschied in der Total-MMP-Aktivität zwischen GT- und RA-SFB. Dies ist neben den Ergebnissen des ELISA und der anderen Aktivitätsbestimmungen ein weiterer Hinweis dafür, dass die Knorpel- und Knochendestruktion in der RA nicht primär auf eine vermehrte Synthese von proMMP, sondern besonders auf eine höhere Prozessierungsrate der bereits vorhandenen proMMP in ihre proteolytisch aktive Form zurückzuführen ist.

Eine verminderte Total-MMP-Aktivität zeigte sich im Vergleich zur Mediumkontrolle/ 1% FKS nach Stimulierung mit IL-1 β bei GT-SFB und nach Stimulierung mit PDGF-BB sowohl bei GT-SFB als auch bei RA-SFB. Die übrigen Stimulierungen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Total-MMP-Aktivität. Folglich scheinen die RA-SFB nur noch auf PDGF-BB mit einer verminderten Total-MMP-Aktivität reagieren zu können. Angesichts der Tatsache, dass die MMP als äußerst potente matrixdegradierende Enzyme ständig einer hochkontrollierten Regulation unterstellt sein müssen, stellt diese Resistenz der RA-SFB gegenüber IL-1 β eine ernstzunehmende Situation dar. Dabei ist aufgrund der unterschiedlichen Spezifitätskonstanten der MMP zum Substratpeptid (siehe Tab. 5, S. 58) verständlich, dass mit diesem Aktivitäts-Assay lediglich ein Trend über die potenzielle Aktivität der verschiedenen MMP in den Überständen der SFB abgegeben werden kann. Unter den von Knight et al. (Knight et al. 1992) untersuchten MMP wies MMP-2 die höchste Spezifitätskonstante zum Peptid auf, während Fasciglione et al. (Fasciglione et al. 2000) eine noch höhere Spezifitätskonstante der MMP-8 beschrieben. Daneben ist der Anteil der einzelnen MMP in den Überständen von entscheidender Rolle. Hierbei ist den Proteinbestimmungen in den Überständen von SFB aus der Literatur zu entnehmen (siehe 6.2.2, S. 87), dass das MMP-2-Protein die größte Fraktion unter den MMP einnehmen dürfte.

Die proMMP-2 stellte nach unseren Ergebnissen in der Zymographie im Vergleich zur prozessierten MMP-2 deutlich die größte Fraktion dar (siehe 6.2.3) und wurde im ELISA, im spezifischen Aktivitäts-Assay und in der Zymographie durch die Stimulierungen nicht beein-

flusst. Dadurch ist die Verminderung der Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay wahrscheinlich auf Aktivitätsänderungen der anderen MMP zurückzuführen. Dies erklärt den fehlenden Einfluss von TNF- α auf die Total-MMP-Aktivität, obwohl TNF- α die Aktivität der prozessierten MMP-2 bei GT-SFB im spezifischen Aktivitäts-Assay und in der Zymographie signifikant verminderte. Die Verminderung der Total-MMP-Aktivität in GT-SFB nach Stimulierung mit IL-1 β legt nun auch für die Gruppe der im unspezifischen Aktivitäts-Assay erfassten MMP eine gewebsschützende Funktion von IL-1 β nahe, die bei RA-SFB aufgehoben sein könnte.

Nach Stimulierung mit PDGF-BB zeigte der unspezifische Aktivitäts-Assay eine signifikante Verminderung der Total-MMP-Aktivität bei GT-SFB und RA-SFB. Bereits im spezifischen Aktivitäts-Assay verminderte PDGF-BB die Aktivität der prozessierten MMP-2 bei sowohl GT-SFB als auch RA-SFB. Damit wird die mögliche gewebsschützende Wirkung von PDGF-BB hinsichtlich der Aktivität von MMP aus SFB (darunter insbesondere auch von MMP-2) weiter bestärkt. Wie bereits beschrieben (siehe 6.2.3.2) sind allerdings weiterführende Untersuchungen erstrebenswert, um die für diese Wirkung verantwortliche PDGF-Isoform bzw. PDGF-Rezeptorkette zu identifizieren. Danach wären eventuell *in vivo* Versuche z. B. mit einem geeigneten PDGF-Analogen denkbar, das die Knorpel- und Knochen-destruktion verhindern könnte.

6.3 Analyse der TIMP in den Überständen von stimulierten GT-SFB mittels Reverser Zymographie

Die Reverse Zymographie ist eine elektrophoretische Methode, um die inhibitorische Aktivität von TIMP in einem Polyacrylamidgel zu erfassen. Wenngleich eine quantitative Erfassung der TIMP im Pikogrammbereich möglich ist (Oliver et al. 1997), wurden die Reversen Zymogramme keiner quantitativen Erfassung der Bandenintensitäten zugeführt. Es fand lediglich der Nachweis der verschiedenen TIMP in den Überständen der SFB statt. In allen Reversen Zymogrammen konnten Banden detektiert werden, die den Molekulargewichten der vier TIMP entsprechen. Die isolierten GT-SFB produzierten *in vitro* unstimuliert (Mediumkontrolle/1% FKS) und unter Einfluss von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB inhibitorisch aktive TIMP, wobei TIMP-1 augenscheinlich die größte Fraktion darstellte (Abb. 20, S. 77). Auch in RA-SFB ließen sich die verschiedenen TIMP detektieren. So wurden in RA-SFB alle vier TIMP auf mRNA-Ebene in Zelllysaten (Kunisch 2003) und TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3

auf Proteinebene in Zellüberständen nachgewiesen (Takizawa et al. 2000). Daher ist anzunehmen, dass in den Überständen der GT- und RA-SFB auch MMP-2/TIMP-Komplexe vorhanden sind, was für die Interpretation der Aktivitätsbestimmungen der MMP-2 von Bedeutung ist (siehe oben). Auch Smolian et al. (Smolian et al. 1995) wiesen in der Reversen Zymographie nach, dass RA-SFB hauptsächlich TIMP-1 und in geringerem Ausmaß TIMP-2 sezernieren und dass Concanavalin A oder Cytochalasin D zu keiner signifikanten Änderung der Sekretion dieser beiden TIMP führten.

Weiterhin liegen bezüglich der Expression von TIMP-2 in der RA unterschiedliche Ergebnisse vor. Zum einen wurde TIMP-2 mittels Immunohistologie und *in situ* Hybridisierung in den hyperplastischen Zellen der Deckzellschicht und in Endothelzellen der RA-SM detektiert (Nawrocki et al. 1994, Yamanaka et al. 2000). Allerdings konnte in einer weiteren Arbeit immunohistologisch kein TIMP-2 in der RA-SM nachgewiesen werden (Hembry et al. 1995). Konttinen et al. (Konttinen et al. 1998) beschrieben eine höhere Expression von TIMP-2 in der GT-SM als in der RA-SM. Außerdem ist TIMP-2 sehr stark an der Knorpel-Pannus-Grenze bei RA-Patienten exprimiert (Konttinen et al. 1998). Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen auf eine regional unterschiedliche Expression von TIMP-2 in der SM mit einer möglicherweise lokal regulierten MMP-2-Aktivität schließen.

6.4 Vergleichende Analyse des spezifischen Aktivitäts-Assays und der Zymographie zur Ermittlung der MMP-2-Aktivität in den Überständen von SFB

Zur Charakterisierung der MMP-2-Aktivität in den stimulierten GT- und RA-SFB wurden ein spezifischer Aktivitäts-Assay und die Zymographie eingesetzt. Nachstehend erfolgt ein methodologischer Vergleich dieser beiden Methoden.

Die Zymographie hat sich nach der Erstbeschreibung von Heussen und Dowdle 1980 (Heussen und Dowdle 1980) zu einer bewährten und anerkannten Technik für Aktivitätsbestimmungen der Gelatinasen entwickelt (Goldbach-Mansky et al. 2000, Honda et al. 2001, Ratnikov et al. 2002, Smith et al. 1999). Einer der großen Vorzüge der Zymographie ist, dass sie die Aktivität der unterschiedlichen Gelatinase-Formen (proMMP-2, prozessierte MMP-2, proMMP-9 und prozessierte MMP-9) in einem Experiment und auf einem Gel getrennt voneinander detektiert, sogar wenn die Gelatinasen zuvor an TIMP gebunden waren (Lê et al. 1999). Wie in der vorliegenden Arbeit sind die Banden der proMMP-2 und prozessierten MMP-2 bei Verwendung eines 10%-igen Polyacrylamidgels deutlich voneinander abgrenzbar

und lassen sich unkompliziert mit einem Bildanalyseprogramm auswerten (Kleiner und Stetler-Stevenson 1994). Weiterhin ist die in der Zymographie verwendete Gelatine das preiswerteste und zugleich gebräuchlichste Substrat, das für die Detektion der Gelatinasen zur Verfügung steht (Ratnikov et al. 2002).

Gemäß Untersuchungen von Kleiner und Stetler-Stevenson (Kleiner und Stetler-Stevenson 1994) sind mit der Zymographie auch quantitative Bestimmungen der MMP-2-Aktivität bis in den Pikogrammbereich möglich (2 pg bzw. 10-20 pg bei Inkubation über 43 h bzw. 18 h). Infolgedessen ist die Sensitivität der Zymographie und anderer Methoden wie z. B. Western-Blot oder ELISA vergleichbar. Auch andere Autoren setzten die Zymographie als quantitative Methode zur Bestimmung der MMP-2-Aktivität ein (Lê et al. 1999).

Einen anderen Standpunkt vertreten z. B. Smith et al. (Smith et al. 1999). Gemäß ihrer Arbeiten ist die Zymographie zwar eine nützliche qualitative und semiquantitative Methode, allerdings fehle es ihr an Spezifität und der Möglichkeit einer tatsächlich quantitativen Erfassung, die hingegen ein Antikörper-basierter und somit spezifischer Aktivitäts-Assay biete. Auch eine Reihe anderer Autoren setzte die Zymographie lediglich zu semiquantitativen Zwecken ein (Han et al. 2001, Xie et al. 2004, Yamanaka et al. 2000).

Da die Angaben in der Literatur zum quantitativen Einsatz der Zymographie zur Bestimmung der MMP-2 widersprüchlich sind, bediente sich die vorliegende Arbeit der Zymographie lediglich zur semiquantitativen Erfassung der Aktivitäten. Dabei wurden die ermittelten Bandenintensitäten der stimulierten Proben zur unstimulierten Mediumkontrolle/1% FKS ins Verhältnis gesetzt.

Jedoch stellte sich bei den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der manchmal sehr geringen Bandenintensitäten der prozessierten MMP-2 (siehe Abb. 15, S. 68) die Frage nach der Sensitivität der Zymographie. Der zufällige Fehler bei der Grauwertmessung des Hintergrundes hatte einen ungleich höheren Einfluss auf eine schwache Bande (Bande der prozessierten MMP-2 bei 66 kDa) als auf eine stärkere Bande (Bande der proMMP-2 bei 72 kDa). Um diesen zufälligen Fehler zu minimieren, wurden alle Grauwertmessungen (ebenso wie die Messungen der Bandenintensitäten) zweimal durchgeführt und daraus der jeweilige Mittelwert errechnet. Eine weitere Problematik betraf die Belichtungswerte beim Einscannen der Gele. Um die schwache Bande (Aktivität der prozessierten MMP-2) ausreichend zu erfassen, bestand hierbei die Gefahr der Überbelichtung der stärkeren Bande (Aktivität der proMMP-2). Die Folge wäre in diesem Fall eine falsch-niedrige Aktivitätsbestimmung der proMMP-2. Es wurde daher größte Sorgfalt bei dem Einscannen jedes einzelnen Gels angewendet. Ein offensichtlicher Vorteil der Zymographie liegt aufgrund der Coomassie-Färbung in der direkten

Visualisierung der Aktivitäten, die sich somit bereits vor dem exakten Ausmessen der Banden visuell grob abschätzen lassen.

Andererseits ist die Stärke des spezifischen Aktivitäts-Assays seine hohe Spezifität aufgrund der Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Außerdem lässt sich in diesem Assay-System neben der Aktivität der prozessierten MMP-2 (nach Aktivierung der in den Überständen freien proMMP-2 durch APMA) auch die Gesamt-MMP-2-Aktivität ermitteln. Dabei sind durch den mitgelieferten Standard quantitative Aktivitätsbestimmungen möglich. Allerdings erfasst der spezifische Aktivitäts-Assay - im Gegensatz zur Zymographie - nicht die TIMP-gebundenen Formen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass der kommerzielle, spezifische Aktivitäts-Assay im Vergleich zur Zymographie deutlich teurer ist.

Die genannten Eigenschaften beider Methoden zeigen, dass ihr Einsatz von der jeweiligen Fragestellung sowie den vorliegenden Begebenheiten abhängt und somit vor jeder Untersuchung erneut abgewogen werden muss. Ein hervorzuhebender Unterschied beider Methoden ist dabei die Aktivitätsbestimmung von verschiedenen MMP-2-Formen: die Zymographie detektiert neben den im Aktivitäts-Assay erfassten freien MMP-2-Formen zusätzlich die TIMP-gebundenen MMP-2-Formen.

6.5 Bedeutung der Korrelationen zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Parametern der Patienten

Die Korrelationsanalysen zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Parametern zeigten einen starken Zusammenhang zwischen der proMMP-2-Proteinkonzentration bei RA-SFB nach Stimulierung mit TNF- α (alle 3 Konzentrationen) und der Erkrankungsdauer. Zudem korrelierte die absolute Total-MMP-Aktivität im unspezifischen Aktivitäts-Assay nach Stimulierung mit TNF- α und PDGF-BB mit Parametern der Akute-Phase-Reaktion (CRP) sowie nach Stimulierung mit PDGF-BB mit der Anzahl der erfüllten ARA-Kriterien. Auch wenn im unspezifischen Aktivitäts-Assay neben der MMP-2 andere MMP erfasst wurden, so scheint die MMP-2-Sekretion aus RA-SFB nach Zytokin- bzw. Wachstumsfaktorstimulierung von den akuten und chronischen Entzündungskomponenten beeinflusst zu werden, die *in vivo* im arthritischen Gelenk vorliegen. Bereits in früheren Untersuchungen wurde berichtet, dass bei RA-Patienten mit hoher Aktivität der prozessierten

MMP-2 eine signifikante Korrelation mit frühen Gelenkserosionen vorliegt (Goldbach-Mansky et al. 2000).

Eine negative Korrelation fand sich im unspezifischen Aktivitäts-Assay. Hier zeigte sich nach Stimulierung der RA-SFB mit IL-1 β eine umso niedrigere prozentuale Induktion der Total-MMP-Aktivität, je älter die RA-Patienten waren. Die Bedeutung dieses Zusammenhangs ist allerdings unklar.

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gewebsdestruktive Wirkung der MMP-2 insbesondere durch die Prozessierung der inaktiven proMMP-2 in proteolytisch aktive, prozessierte MMP-2 reguliert wird. Diese Annahme wird durch die von den Zytokinstimulationen unbeeinflusste MMP-2-mRNA-Expression, proMMP-2-Konzentration sowie Gesamt-MMP-2-Aktivität in GT- und RA-SFB bekräftigt (Abb. 22, S. 82). Auf diesen Ebenen scheint daher nur eine schwache Regulierung der MMP-2 vorhanden zu sein. Wir postulieren, dass die MMP-2 in den Geweben *in vivo* grundsätzlich inaktiv vorliegt, wie bereits aus den Ergebnissen von Yamanaka et al. (Yamanaka et al. 2000) angenommen werden kann. Physiologischerweise wird prozessierte MMP-2 nach diesem Modell nur bei Bedarf durch gezielte Stimuli (z. B. bei Umbauvorgängen) aus dem proMMP-2/TIMP-2/MMP-14-Komplex freigesetzt. Nach der Prozessierung geringer Mengen an der Zelloberfläche wird die prozessierte MMP-2 anschließend innerhalb kurzer Zeit durch Bindung an TIMP inhibiert (Ratnikov et al. 2002). Somit ist die MMP-2 nur für kurze Zeit und nur in unmittelbarer Umgebung der SFB proteolytisch aktiv. Dementsprechend wird die Aktivität der MMP-2 lokal durch ein exakt eingestelltes Gleichgewicht zwischen Prozessierung durch MMP-14 und Inhibierung durch TIMP reguliert (Goldbach-Mansky et al. 2000). In der RA und bei Tumorerkrankungen scheint es zu einer Fehlregulation dieses akkurat eingestellten Mechanismus zu kommen, wie die Ergebnisse des spezifischen Aktivitäts-Assays (ohne APMA; siehe Abb. 17, S. 71) vermuten lassen. Die Folge ist eine unkontrollierte Erhöhung der MMP-2-Aktivität, die entscheidend zur Knorpel- und Knochendestruktion in der RA beiträgt.

In der RA könnte diese Fehlregulation der MMP-2-Aktivität zumindest teilweise auf eine verminderte Ansprechbarkeit der RA-SFB auf gewebsprotektive Signale zurückzuführen sein. Hierfür liefert die vorliegende Arbeit Hinweise, da die Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α die Aktivität der freien prozessierten MMP-2 lediglich in GT-SFB, aber nicht in RA-SFB verminderte (Abb. 17, S. 71). Eine weitere Begründung für die fehlregulierte MMP-2-Aktivität könnte eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen TIMP-gebundener und freier prozessierter MMP-2 darstellen (Goldbach-Mansky et al. 2000). Um dies näher zu ergründen, sind allerdings weitere differenzierte Untersuchungen dieser prozessierten MMP-2-Formen erforderlich.

Aufgrund der genannten Resistenz der RA-SFB gegenüber der gewebsprotektiven Wirkung von IL-1 β und TNF- α muss somit ein anderer Weg gefunden werden, um die Aktivität der MMP-2 zu hemmen. Für *in vitro* Versuche liegt eine Vielzahl synthetischer Matrixmetal-

loproteinasen-Inhibitoren (MMPI) vor, worunter auch spezifische MMPI für die Inhibition von Gelatinasen entwickelt wurden (siehe 2.3.4.2). Mittels dieser spezifischen MMPI ist eine Verminderung der MMP-2-Aktivität bei RA-Patienten auf das Niveau bei GT-Patienten zumindest theoretisch denkbar. So könnte bei RA-Patienten eine lokale Applikation dieser MMPI in entzündete Gelenke Anwendung finden, die durch erhöhte Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gekennzeichnet sind. Natürlich wären noch weiterführende Studien notwendig, um solch eine Therapiestrategie zu rechtfertigen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bisherige Studien (darunter auch klinische Studien an RA- und Tumorpatienten) mit unspezifischen und spezifischeren MMPI wie Trocade oder Tanomastat (BAY 12-9566) aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen wie z. B. erhöhten Metastasierungsraten enttäuschende Resultate erbrachten (Egeblad und Werb 2002, Jackson et al. 2001, Jani et al. 2005, Overall und Lopez 2002, Yoshizaki et al. 2002).

Eine andere Möglichkeit stellen spezifische Ribozyme dar, die gezielt mRNA schneiden und auch die nachfolgende Proteinsynthese hemmen (Egeblad und Werb 2002). Zukünftige Studien werden zeigen, ob diese Technik in der klinischen Behandlung der RA angewendet werden kann, um die MMP-2-Synthese gezielt zu inhibieren. Auch das Potenzial der RNA-Interferenz (RNAi) mit der Aussicht auf das Stilllegen der MMP-2-mRNA ist noch nicht absehbar. Des Weiteren könnten genauere Untersuchungen zur Beeinflussung der MMP-2-Aktivität mit der kürzlich entdeckten Familie der Testicane einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von MMP-2 in der RA leisten.

Weiterhin deuten die verminderte Aktivität der prozessierten MMP-2 und die verminderte Total-MMP-Aktivität bei mit PDGF-BB stimulierten GT- und RA-SFB darauf hin, dass PDGF-BB sowohl bei GT-SFB als auch bei RA-SFB gewebsschutzend wirkt (Abb. 17, S. 71 bzw. Abb. 19, S. 75). Folglich ist die physiologische Ansprechbarkeit der RA-SFB auf PDGF-BB intakt. Als universelles PDGF-Rezeptor-Stimulans stimuliert PDGF-BB allerdings beide PDGF-Rezeptorketten. Daher müssen zunächst weitere Untersuchungen mit spezifischen PDGF-Rezeptorketten-Agonisten und -Antagonisten durchgeführt werden, um die kausale PDGF-Isoform bzw. PDGF-Rezeptorkette für diesen erstmalig beschriebenen gewebsschutzenden Effekt zu identifizieren.

Allerdings weist PDGF (z. B. durch die gewebsschutzende Wirkung) in der RA auch unerwünschte Einflüsse auf und kann somit zum Destruktionsprozess im Gelenk beitragen (siehe 2.2.3, S. 19). Ein weiteres Ziel ist daher die Detektion des kausalen Signaltransduktionswegs für die neu entdeckte, gewebsschutzende Wirkung von PDGF-BB in SFB. Hierfür wären

Erkenntnisse aus Knockout-Modellen von Nutzen, wie z. B. PDGF-Isoform-Knockout oder PDGF-Rezeptorketten-Knockout. Weiterhin sind Versuche mit transgenen Tiermodellen wünschenswert, um die Auswirkungen einer Überexpression von bestimmten PDGF-Isoformen auf SFB bzw. auf die SM zu untersuchen. In der Folge könnte bei *in vivo* Versuchen eventuell ein entsprechendes PDGF-Analogon verwendet werden, um der fortschreitenden Knorpel- und Knochendestruktion in der RA entgegenzuwirken.

In bisherigen Studien wurden nicht-gereinigte, wiederholt passagierte SFB anstelle gereinigter, kurz-passasierter SFB wie in der vorliegenden Studie (3. bzw. 2. Passage) eingesetzt und außerdem keine Zytokinstimulierungen durchgeführt. Auf den neuen Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit basierend sind nun weiterführende Untersuchungen zur MMP-2-Aktivierung unter Zytokineinfluss bei GT- und RA-SFB (u. a. an MMP-14, TIMP-2 und deren Signaltransduktionen) erstrebenswert. Besonderes Augenmerk verdient nach den vorliegenden Ergebnissen die mögliche gewebsschützende Wirkung von IL-1 β und TNF- α bei GT-SFB, die bei RA-SFB aufgehoben zu sein scheint, sowie ein möglicher therapeutischer Einsatz von PDGF-BB zur Verminderung der MMP-Aktivität bei RA-SFB. Ebenfalls wünschenswert wären in diesem Zusammenhang Experimente mit Kokulturen aus Entzündungszellen und SFB der SM. Damit ließen sich weitere Einblicke in die komplexe MMP-2-Regulation in einem Milieu erhalten, das durch zusätzliche Signale aus Zell-Zell-Kontakten, prozessierenden Enzymen (auch von anderen Zellen) und einem umfangreicheren Zytokinnetzwerk eher der *in vivo* Situation entspricht. Diese *in vivo* Situation zeichnet sich durch eine multifaktoriell und differenziert abgestimmte Beeinflussung der SFB aus.

Zusammenfassend erbrachte die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über den Einfluss von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB auf die *in vitro* von GT-SFB und RA-SFB sezernierte MMP-2. Insbesondere die Resistenz der RA-SFB gegenüber der gewebsschützenden Wirkung von IL-1 β und TNF- α sowie die gewebsschützende Wirkung von PDGF-BB auf GT-SFB und RA-SFB führen zu einer vollkommen neuen Betrachtungsweise bezüglich der Rolle dieser Zytokine in der RA. Somit liefert diese Arbeit auch neue Aspekte für die kritische Rolle der MMP-2 als hochpotente matrixdegradierende Proteinase in der Pathogenese und der Gelenkdestruktion in der RA.

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Ahokas K, Lohi J, Illman SA, Llano E, Elomaa O, Impola U, Karjalainen L, Saarialho K. 2003. Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. *Lab Invest*, 83(12):1887-1899.
- Ahokas K, Lohi J, Lohi H, Elomaa O, Karjalainen L, Kere J, Saarialho K. 2002. Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene*, 301(1-2):31-41.
- Aicher WK, Heer AH, Trabandt A, Bridges SL, Jr., Schroeder HW, Jr., Stransky G, Gay RE, Eibel H, Peter HH, Siebenlist U. 1994. Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol*, 152(12):5940-5948.
- Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD, Stetler S. 1991. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst*, 83(11):775-779.
- Alsalameh S, Amin RJ, Kunisch E, Jasin HE, Kinne RW. 2003. Preferential Induction of Prodestructive Matrix Metalloproteinase-1 and Proinflammatory Interleukin 6 and Prostaglandin E₂ in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts via Tumor Necrosis Factor Receptor-55. *J Rheumatol*, 30(8):1680-90.
- Alsalameh S, Winter K, Al-Ward R, Wendler J, Kalden JR, Kinne RW. 1999. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. *Scand J Immunol*, 49(3):278-285.
- Alvares O, Klebe R, Grant G, Cochran DL. 1995. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 66(7):552-558.
- Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. 1990. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest*, 86(6):1790-1798.
- Apparailly F, Noel D, Millet V, Baker AH, Lisignoli G, Jacquet C, Kaiser MJ, Sany J, Jorgensen C. 2001. Paradoxical effects of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene transfer in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 44(6):1444-1454.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3):315-324.
- Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR. 1999. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res*, 59(4):798-802.
- Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, Rio MC. 1997. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol*, 15(8-9):535-541.
- Bein K, Simons M. 2000. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem*, 275(41):32167-32173.

- Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, Shapiro SD. 1995. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 270(24):14568-14575.
- Bernardo MM, Fridman R. 2003. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J*, 374(3):739-45.
- Betsholtz C. 2003. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69(4):272-285.
- Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD, Overall CM. 2001. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4 Inhibits But Does Not Support the Activation of Gelatinase A via Efficient Inhibition of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase. *Cancer Res*, 61(9):3610-3618.
- Blaschke S, Koziol M, Schwarz A, Benohr P, Middel P, Schwarz G, Hummel KM, Muller GA. 2003. Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 30(9):1918-1927.
- Blaschke V, Reich K, Blaschke S, Zipprich S, Neumann C. 2000. Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *J Immunol Methods*, 246(1-2):79-90.
- Bode W, Maskos K. 2003. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*, 384(6):863-872.
- Borden P, Heller RA. 1997. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 7(1-2):159-178.
- Borghaei RC, Rawlings PLJ, Mochan E. 1998. Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 41(8):1398-1406.
- Borkakoti N. 2004. Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 1):17-20.
- Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar JM, Maini RN, Feldmann M. 1997. Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy. *Br J Rheumatol*, 36(6):643-650.
- Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41(12):2196-2204.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2):267-283.
- Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M. 1988. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *Clin Exp Immunol*, 73(3):449-455.
- Buisson-Legendre N, Smith S, March L, Jackson C. 2004. Elevation of activated protein C in synovial joints in rheumatoid arthritis and its correlation with matrix metalloproteinase 2. *Arthritis Rheum*, 50(7):2151-6.

- Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW. 1997. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*, 40(1):5-18.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169-193.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29(1):23-39.
- Butler DM, Feldmann M, Di Padova F, Brennan FM. 1994. p55 and p75 tumor necrosis factor receptors are expressed and mediate common functions in synovial fibroblasts and other fibroblasts. *Eur Cytokine Netw*, 5(5):441-448.
- Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. 1995. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw*, 6(4):225-230.
- Calvo F, Alarcón GS. 2000. Epidemiology of rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Panayi GS, Wollheim FA. *Rheumatoid Arthritis: New Frontiers in Pathogenesis and Treatment*. Oxford: Oxford University Press, 15-26.
- Campion GV, Lebsack ME, Lookabaugh J, Gordon G, Catalano M. 1996. Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum*, 39(7):1092-1101.
- Capper SJ, Verheijen J, Smith L, Sully M, Visser H, Hanemaaijer R. 1999. Determination of gelatinase-A (MMP-2) activity using a novel immunocapture assay. *Ann N Y Acad Sci*, 878:487-490.
- Carmichael DF, Stricklin GP, Stuart JM. 1989. Systemic administration of TIMP in the treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Agents Actions*, 27(3-4):378-379.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9):3666-3670.
- Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL. 1989. Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. *Am J Pathol*, 135(6):1055-1064.
- Cawston T. 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today*, 4(3):130-137.
- Choy EH, Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344(12):907-916.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, 261(5120):472-475.
- Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Jr., Stetler-Stevenson WG. 1996. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein*, 49(1-3):7-19.
- Crick F. 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258):561-3.
- Curry TE, Osteen KG. 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*, 24(4):428-465.

- Davis LS. 2003. A question of transformation: the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*, 162(5):1399-1402.
- Dayer JM. 2002. The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 69(2):123-132.
- Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest*, 77(2):645-648.
- de Coignac AB, Elson G, Delneste Y, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry JP, Berthier O, Schmitt D, Bonnefoy JY, Gauchat JF. 2000. Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur J Biochem*, 267(11):3323-3329.
- DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K, Martel-Pelletier J. 1995. Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol Suppl*, 43:123-8:123-128.
- Dimmeler S. 2005. Platelet-Derived Growth Factor CC -- A Clinically Useful Angiogenic Factor at Last? *N Engl J Med*, 352(17):1815-1816.
- Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ. 1985. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, 318(6041):66-69.
- Duszyk M, Shu Y, Sawicki G, Radomski A, Man SF, Radomski MW. 1999. Inhibition of matrix metalloproteinase MMP-2 activates chloride current in human airway epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 77(7):529-535.
- Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. 1988. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8613):706-709.
- Egeblad M, Werb Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3):161-174.
- Ellerbroek SM, Stack MS. 1999. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bio-Essays*, 21(11):940-949.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 344(8930):1105-1110.
- Emmert B, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA, Stetler S. 1994. Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am J Pathol*, 145(6):1285-1290.
- Fasciglione GF, Marini S, D'Alessio S, Politi V, Coletta M. 2000. pH- and temperature-dependence of functional modulation in metalloproteinases. A comparison between neutrophil collagenase and gelatinases A and B. *Biophys J*, 79(4):2138-2149.
- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis*, 18(2):111-120.
- Firestein GS. 1996. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, 39(11):1781-1790.

- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937):356-361.
- Firestein GS, Alvaro G, Maki R, Alvaro G. 1990. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 144(9):3347-3353.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. 2002. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum*, 46(2):298-308.
- Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, Muller L, Gay RE, Gay S. 2000. Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(3):599-607.
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. 2004. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(4):197-204.
- Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. 2004. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(5):409-418.
- Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL. 1985. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*, 315(6022):768-771.
- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ. 1998. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol*, 16(8):483-496.
- Gohji K, Fidler IJ, Tsan R, Radinsky R, von E, Tsuruo T, Nakajima M. 1994. Human recombinant interferons-beta and -gamma decrease gelatinase production and invasion by human KG-2 renal-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 58(3):380-384.
- Goldbach-Mansky R, Lee JM, Hoxworth JM, Smith D, Duray P, Schumacher RH, Yarboro CH, Klippel J, Kleiner D, El G. 2000. Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. *Arthritis Res*, 2(2):145-153.
- Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH. 1991. In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 34(9):1076-1084.
- Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. 1996. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*, 271(48):30375-30380.
- Gross J, Lapière C. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 48:1014-1022.
- Guedez L, Courtemanch L, Stetler S. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*, 92(4):1342-1349.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol*, 19(3):1720-1730.
- Hamerman D, Taylor S, Kirschenbaum I, Klagsbrun M, Raines EW, Ross R, Thomas KA. 1987. Growth factors with heparin binding affinity in human synovial fluid. *Proc Soc Exp Biol Med*, 186(3):384-389.

- Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. 2001. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*, 114(1):131-139.
- Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van H, V, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T. 1997. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- alpha and doxycycline. *J Biol Chem*, 272(50):31504-31509.
- Hausser HJ, Brenner RE. 2004. Testican-1, an inhibitor of pro-MMP-2 activation, is expressed in cartilage. Poster presentation at the Annual Meeting of the German Connective Tissue Society. March 2004. Jena. Germany.
- Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT. 2001. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol Biol*, 151:399-410.
- Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. 1994. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, 107(Pt 9):2373-2379.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*, 298(1):29-32.
- Hecker-Kia A, Kolkenbrock H, Orgel D, Zimmermann B, Sparmann M, Ulbrich N. 1997. Substance P induces the secretion of gelatinase A from human synovial fibroblasts. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 35(9):655-60.
- Heldin CH, Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79(4):1283-1316.
- Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL. 1995. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 54(1):25-32.
- Heussen C, Dowdle EB. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*, 102(1):196-202.
- Hiraoka K, Sasaguri Y, Komiya S, Inoue A, Morimatsu M. 1992. Cell proliferation-related production of matrix metalloproteinases 1 (tissue collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Int*, 27(6):1083-1091.
- Hirth A, Skapenko A, Kinne RW, Emmrich F, Schulze K, Sack U. 2002. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4(2):117-125.
- Honda S, Migita K, Hirai Y, Origuchi T, Yamasaki S, Kamachi M, Shibatomi K, Fukuda T, Kita M, Hida A, Ida H, Aoyagi T, Kawakami A, Kawabe Y, Oizumi K, Eguchi K. 2001. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol*, 126(1):131-136.
- Huber R, Kunisch E, Gluck B, Egerer R, Sickinger S, Kinne RW. 2003. [Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of junB mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients]. *Z Rheumatol*, 62(4):378-389.

- Huber R, Stuhlmüller B, Kunisch E, Kinne R. 2005. Discrepancy between jun/fos proto-oncogene mRNA and protein expression in the rheumatoid arthritis synovial membrane [Abstract]. 25th European Workshop for Rheumatology Research. 24.-26. Februar 2005. Glasgow. United Kingdom.
- Illman SA, Keski O, Parks WC, Lohi J. 2003. The mouse matrix metalloproteinase, epilysin (MMP-28), is alternatively spliced and processed by a furin-like proprotein convertase. *Biochem J*, 375(Pt 1):191-197.
- Imai S, Kontinen YT, Jumppanen M, Lindy O, Ceponis A, Kempainen P, Sorsa T, Santavirta S, Xu JW, Lopez O. 1998. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J Bone Joint Surg Br*, 80(4):701-710.
- Impola U, Toriseva M, Suomela S, Jeskanen L, Hieta N, Jahkola T, Grenman R, Kahari VM, Saarialho K. 2003. Matrix metalloproteinase-19 is expressed by proliferating epithelium but disappears with neoplastic dedifferentiation. *Int J Cancer*, 103(6):709-716.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. 1998. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, 58(5):1048-1051.
- Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P. 2001. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis - Targetting gelatinase A activation. *Inflammation Research*, 50(4):183-186.
- Jani M, Tordai H, Trexler M, Banyai L, Patthy L. 2005. Hydroxamate-based peptide inhibitors of matrix metalloprotease 2. *Biochimie*, 87(3-4):385-92.
- Jeong JG, Kim JM, Cho H, Hahn W, Yu SS, Kim S. 2004. Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1):3-7.
- Jo C, Rha SY, Oh BK, Koo JS, Kim YJ, Choi J, Park C, Park YN. 2004. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in intraductal and non-intraductal growth type of cholangiocarcinoma. *Am J Gastroenterol*, 99(1):68-75.
- Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. 1996. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum*, 39(5):797-809.
- Katerinaki E, Evans GS, Lorigan PC, MacNeil S. 2003. TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. *Br J Cancer*, 89(6):1123-1129.
- Kaufman DR, Choi Y. 1999. Signaling by tumor necrosis factor receptors: pathways, paradigms and targets for therapeutic modulation. *Int Rev Immunol*, 18(4):405-427.
- Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. 1995. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 54(6):501-504.
- Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. 1997. T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: villains or accomplices? *Biochim Biophys Acta*, 1360(2):109-141.
- Kinne RW. 1999. Molekulare Veränderungen in synovialen Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis. In: Die Bedeutung von Zellen und Molekülen in der chronischen Entzündung am Beispiel der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol*, 58:370-371.

- Kinne RW, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. 2000. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Panayi GS, Wollheim FA. Rheumatoid Arthritis: New Frontiers in Pathogenesis and Treatment. Oxford: Oxford University Press, 69-87.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem*, 218(2):325-329.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, (43):S42-S51.
- Knight CG, Willenbrock F, Murphy G. 1992. A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett*, 296(3):263-266.
- Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. 1995. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Investig Med*, 43(1):28-38.
- Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Konttinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R. 1999. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol*, 17(8):768-774.
- Kolb C, Mauch S, Krawinkel U, Sedlacek R. 1999. Matrix metalloproteinase-19 in capillary endothelial cells: expression in acutely, but not in chronically, inflamed synovium. *Exp Cell Res*, 250(1):122-130.
- Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. 1997. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett*, 57(1-3):83-88.
- Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, Salo T, Ma J, Santavirta S, Seiki M. 1998. New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. *Matrix Biol*, 17(8-9):585-601.
- Konttinen YT, Li TF, Hukkanen M, Ma J, Xu JW, Virtanen I. 2000. Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res*, 2(5):348-355.
- Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M. 1999. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58(11):691-697.
- Kraan MC, Reece RJ, Smeets TJ, Veale DJ, Emery P, Tak PP. 2002. Comparison of synovial tissues from the knee joints and the small joints of rheumatoid arthritis patients: Implications for pathogenesis and evaluation of treatment. *Arthritis & Rheumatism*, 46(8):2034-2038.
- Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL. 1989. Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol*, 143(3):833-837.
- Kunisch E. 2002. Expression von gewebsdestruierenden Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren in kurz-kultivierten synovialen Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5.

- Lê J, Dauchot P, Perrot JL, Cambazard F, Frey J, Chamson A. 1999. Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxyproline: application to gelatinases A and B. *Electrophoresis*, 20(14):2824-2829.
- Lee T, Esemuede N, Sumpio BE, Gahtan V. 2003. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg*, 38(1):147-154.
- Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo RM. 1997. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol*, 36(7):735-743.
- Lhotak S, Elavathil LJ, Vukmirović P, Duivenvoorden WC, Tozer RG, Singh G. 2000. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in clinical specimens of bone metastasis from breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 18(6):463-470.
- Li X, Eriksson U. 2003. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(2):91-98.
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. 2003. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 288(1):208-217.
- Lindy O, Kontinen YT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, Lopez-Otin C. 1997. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 40(8):1391-1399.
- Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. 1979. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(5):2268-2272.
- Llano E, Pendas AM, Knauper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, Lopez-Otin C. 1997. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*, 36(49):15101-15108.
- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. 2001. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *J Biol Chem*, 276(13):10134-10144.
- Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grunke M, Schwerdtner N, Nusslein H, Woody J, Kalden JR, Manger B. 1996. In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol*, 156(4):1646-1653.
- Lu KH, Yang SF, Chu SC, Chen PN, Chou MC, Hsiao TY, Hsieh YS. 2004. The significance of altered gelatinase expression in the synovium of patient with arthritic effusions. *Clin Rheumatol*, 23(1):21-6.
- Lydyard PM, Edwards JC. 1994. The pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 12(Suppl 11):S55-S58.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. 1990. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem*, 265(28):17238-17245.

- Maini RN. 2003. Rheumatoid Arthritis. In: Warrell DA, Cox TM, Firth JD, Edward JB Jr. Oxford Textbook of Medicine. Fourth Edition. Oxford: Oxford University Press, 18.5(1-16).
- Martin-Chouly CA, Astier A, Jacob C, Pruniaux MP, Bertrand C, Lagente V. 2004. Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci*, 75(7):823-40.
- Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T. 2001. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol*, 28(1):22-28.
- McCachren SS, Haynes BF, Nield JE. 1990. Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol*, 10(1):19-27.
- McInnes IB, Leung BP, Liew FY. 2000. Cell-cell interactions in synovitis: Interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res*, 2(5):374-378.
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI. 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J*, 10(10):2821-2832.
- Meller D, Li DQ, Tseng SCG. 2000. Regulation of Collagenase, Stromelysin, and Gelatinase B in Human Conjunctival and Conjunctivochalasis Fibroblasts by Interleukin-1{beta} and Tumor Necrosis Factor-{alpha}. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10):2922-2929.
- Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Hu Y, Chung L, Nagase H, Bode W, Maskos K, Brew K. 1999. Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate. *J Biol Chem*, 274(15):10184-10189.
- Mercer E, Cawston TE, de Silva M, Hazleman BL. 1985. Purification of a metalloproteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem J*, 231(3):505-510.
- Migita K, Miyashita T, Ishibashi H, Maeda Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. 2004. Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1beta stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 137(3):612-6.
- Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Ichinose Y, Tsukada T, Aoyagi T, Nakamura H, Nagataki S. 1996. TNF-alpha-mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*, 89(4):553-557.
- Miossec P, Dinarello CA, Ziff M. 1986. Interleukin-1 lymphocyte chemotactic activity in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum*, 29(4):461-470.
- Miyasaka N, Sato K, Goto M, Sasano M, Natsuyama M, Inoue K, Nishioka K. 1988. Augmented interleukin-1 production and HLA-DR expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients. Possible involvement in joint destruction. *Arthritis Rheum*, 31(4):480-486.
- Miyazaki K, Umenishi F, Funahashi K, Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M. 1992. Activation of TIMP-2/progelatinase A complex by stromelysin. *Biochem Biophys Res Commun*, 185(3):852-9.
- Mohr W. 1984. Gelenkkrankheiten. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Moore BA, Aznavoorian S, Engler JA, Windsor LJ. 2000. Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1502(2):307-318.

- Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwitz DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Blosch CM, Lange ML, McDonnell ND, Weinblatt ME. 1999. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 130(6):478-486.
- Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. 1999. Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. *Science*, 284(5420):1667-1670.
- Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. 2001. Cellular Activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP Occurs via a TIMP-2-independent Pathway. *J Biol Chem*, 276(50):47402-47410.
- Müller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN, Gay RE, Robbins PD, Evans CH, Gay S. 1997. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol*, 158(7):3492-3498.
- Murphy G, Crabbe T. 1995. Gelatinases A and B. *Methods Enzymol*, 248:470-484.
- Murphy G, Knäuper V. 1997. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, 15(8-9):511-518.
- Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. 2002. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S39-S49.
- Murphy G, McGuire MB, Russell RG, Reynolds JJ. 1981. Characterization of collagenase, other metallo-proteinases and an inhibitor (TIMP) produced by human synovium and cartilage in culture. *Clin Sci (Colch)*, 61(6):711-716.
- Murray GI, Duncan ME, Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. 1998. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol*, 185(3):256-261.
- Murray GI, Duncan ME, Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. 1996. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med*, 2(4):461-462.
- Nagase H, Brew K. 2002. Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res*, 4(Suppl 3):S51-S61.
- Nawrocki B, Polette M, Clavel C, Morrone A, Eschard JP, Etienne JC, Birembaut P. 1994. Expression of stromelysin 3 and tissue inhibitors of matrix metallo- proteinases, TIMP-1 and TIMP-2, in rheumatoid arthritis. *Pathol Res Pract*, 190(7):690-696.
- Neidel J, Schulze M, Lindschau J. 1995. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 44(5):217-221.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. 1999. Thrombin rapidly and efficiently activates gelatinase A in human microvascular endothelial cells via a mechanism independent of active MT1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest*, 79(4):467-475.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. 2000. Activated Protein C Directly Activates Human Endothelial Gelatinase A. *J Biol Chem*, 275(13):9095-9098.
- O'Gradaigh D, Watts RA, Scott DGI. 2000. Extra-articular features of rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Panayi GS, Wollheim FA. *Rheumatoid Arthritis: New Frontiers in Pathogenesis and Treatment*. Oxford: Oxford University Press, 227-241.

- Ogura N, Tobe M, Sakamaki H, Nagura H, Abiko Y, Kondoh T. 2005. Tumor necrosis factor-alpha increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*, 34(6):357-63.
- Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H. 1990. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem*, 194(3):721-30.
- Okada Y, Gonoji Y, Nakanishi I, Nagase H, Hayakawa T. 1990. Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 59(5):305-312.
- Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. 1997. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal Biochem*, 244(1):161-6.
- Overall CM, Lopez O. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2(9):657-672.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem*, 266(21):14064-14071.
- Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. 1996. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(7):1082-1091.
- Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S. 2000a. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res*, 2(1):59-64.
- Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough JK, Simmen B, Gay RE, Billingham M, Gay S. 2000b. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(6):1226-1232.
- Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. 2000c. Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2(5):361-367.
- Pei D. 1999. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem*, 274(13):8925-8932.
- Pei D, Kang T, Qi H. 2000. Cysteine Array Matrix Metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 Is a Type II Transmembrane Matrix Metalloproteinase Regulated by a Single Cleavage for Both Secretion and Activation. *J Biol Chem*, 275(43):33988-33997.
- Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Haines K, Pope RM. 2000. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol*, 164(10):5227-5235.
- Pincus T, Callahan LF. 1986. Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously--predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. *J Rheumatol*, 13(5):841-845.
- Pohlert D, Huber R, Ukena B, Kinne RW. 2005. Expression of PDGF-C and PDGF-D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, in press.

- Qin H, Moellinger JD, Wells A, Windsor LJ, Sun Y, Benveniste EN. 1998. Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human astroglioma cells by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol*, 161(12):6664-6673.
- Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. 2002. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest*, 82(11):1583-1590.
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293(5532):1089-93.
- Remmers EF, Lafyatis R, Kumkumian GK, Case JP, Roberts AB, Sporn MB, Wilder RL. 1990. Cytokines and growth regulation of synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis and rats with streptococcal cell wall arthritis. *Growth Factors*, 2(2-3):179-188.
- Remmers EF, Sano H, Lafyatis R, Case JP, Kumkumian GK, Hla T, Maciag T, Wilder RL. 1991a. Production of platelet derived growth factor B chain (PDGF-B/c-sis) mRNA and immunoreactive PDGF B-like polypeptide by rheumatoid synovium: coexpression with heparin binding acidic fibroblast growth factor-1. *J Rheumatol*, 18(1):7-13.
- Remmers EF, Sano H, Wilder RL. 1991b. Platelet-derived growth factors and heparin-binding (fibroblast) growth factors in the synovial tissue pathology of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 21(3):191-199.
- Ribbens C, Andre B, Kaye O, Kaiser MJ, Bonnet V, Jaspar JM, de Groote D, Franchimont N, Malaise MG. 2000. Synovial fluid matrix metalloproteinase-3 levels are increased in inflammatory arthritides whether erosive or not. *Rheumatology*, 39(12):1357-1365.
- Ries C, Petrides PE. 1995. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376(6):345-355.
- Rosenblum G, Meroueh SO, Kleifeld O, Brown S, Singson SP, Fridman R, Mobashery S, Sagi I. 2003. Structural Basis for Potent Slow Binding Inhibition of Human Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2). *J Biol Chem*, 278(29):27009-27015.
- Rubin K, Terracio L, Ronnstrand L, Heldin CH, Klareskog L. 1988. Expression of platelet-derived growth factor receptors is induced on connective tissue cells during chronic synovial inflammation. *Scand J Immunol*, 27(3):285-294.
- Ruof J, Hulsemann JL, Mittendorf T, Handelsmann S, von der S, Zeidler H, Merkesdal S. 2003. Costs of rheumatoid arthritis in Germany: a micro-costing approach based on healthcare payer's data sources. *Ann Rheum Dis*, 62(6):544-549.
- Saalbach A, Kraft R, Herrmann K, Haustein UF, Anderegg U. 1998. The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Arch Dermatol Res*, 290(7):360-366.
- Saarialho K, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski O, Lohi J. 2002. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J Invest Dermatol*, 119(1):14-21.
- Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M. 1992. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, 7(1):77-83.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 46(1-2):69-81.

- Schonbeck U, Mach F, Libby P. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 161(7):3340-3346.
- Schurigt U, Stopfel N, Hückel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Bräuer R. 2005. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(1):R174-R188.
- Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinert M, Wittekind C. 2002. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumour Biol*, 23(3):179-184.
- Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ. 1987. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet*, 1(8542):1108-1111.
- Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schatzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U. 1998. Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunobiology*, 198(4):408-423.
- Seemayer CA, Kuchen S, Kuenzler P, Rihoskova V, Rethage J, Aicher WK, Michel BA, Gay RE, Kyburz D, Neidhart M, Gay S. 2003. Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*, 162(5):1549-1557.
- Seiki M. 1999. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS*, 107(1):137-143.
- Shapiro SD. 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 10(5):602-608.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. 1993. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*, 268(32):23824-23829.
- Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B. 2001. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 95(2):167-74.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanbeck K, Grabstein KH, Dower SK. 1993. Interleukin 1 Signaling Occurs Exclusively via the Type I Receptor. *PNAS*, 90(13):6155-6159.
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*, 241(4865):585-589.
- Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP. 2003. Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62(7):635-638.
- Smith L, Marengi AS, Capper SJ. 1999. Determination of species cross-reactivity using MMP-2 Activity Assay and correlation with ELISA and gelatin zymography. *Life Science News*, 3:1-3.
- Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. 1997. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 9(10):770-780.

- Smith TJ, Sempowski GD, Wang HS, Del Vecchio PJ, Lippe SD, Phipps RP. 1995. Evidence for cellular heterogeneity in primary cultures of human orbital fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(9):2620-2625.
- Smolian H, Aurer A, Sittlinger M, Zacher J, Bernimoulin JP, Burmester GR, Kolkenbrock H. 1995. Secretion of gelatinases and activation of gelatinase A (MMP-2) by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biol Chem*, 382(10):1491-1499.
- Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. 2000. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol*, 164(5):2660-2666.
- Solomon A, Li DQ, Lee SB, Tseng SC. 2000. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(8):2154-2163.
- Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol*, 22(1):55-61.
- Spencer-Green G. 2001. Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. *Ann Rheum Dis*, 59(Suppl 1):i46-i49.
- Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, Offner FA, Mikuz G, Dirnhofer S, Moch H. 2003. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 39(17):2499-2505.
- Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, Lopez-Otin C. 1997. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, 76(5):717-728.
- Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G, Knauper V. 1999. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem* 2000 May, 275(20):14809-14816.
- Takizawa M, Ohuchi E, Yamanaka H, Nakamura H, Ikeda E, Ghosh P, Okada Y. 2000. Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 43(4):812-820.
- Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N, Terada Y, Ito H, Hirokawa K, Miyasaka N. 1999. Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Med*, 5(7):760-767.
- Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M. 2000. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J*, 14(12):1674-1676.
- Tetlow LC, Woolley DE. 1999. The effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on matrix metalloproteinase and prostaglandin E(2) production by cells of the rheumatoid lesion. *Arthritis Res*, 1(1):63-70.
- Tolboom TC, Pieterman E, van d, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, Breedveld FC, Huizinga TW. 2002. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis*, 61(11):975-980.

- Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez B, Fridman R. 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(2):386-395.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, 309(2):293-300.
- Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. 2003. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis*, 62(3):196-203.
- Uria JA, Lopez-Otin C. 2000. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res*, 60(17):4745-4751.
- Uria JA, Stahle B, Seiki M, Fueyo A, Lopez O. 1997. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res*, 57(21):4882-4888.
- Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. 1998. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol*, 152(4):1005-1014.
- van den Berg WB, Bresnihan B. 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, 13(4):577-597.
- van Lent PL, van de Loo FA, Holthuysen AE, Van Den Bersselaar LA, Vermeer H, van den Berg WB. 1995. Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J Rheumatol*, 22(12):2250-2258.
- Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knauper V, Murphy G, Lopez O. 1999. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem*, 274(8):4570-4576.
- Verheijen JH, Nieuwenbroek NM, Beekman B, Hanemaaijer R, Verspaget HW, Runday HK, Bakker AH. 1997. Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem J*, 323(Pt 3):603-609.
- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8):827-839.
- Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW. 1992. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum*, 35(1):35-42.
- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. 2000. TIMP-2 Is Required for Efficient Activation of proMMP-2 in Vivo. *J Biol Chem*, 275(34):26411-26415.
- Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF. 1999. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sci*, 65(5):449-481.

- Welgus HG, Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA, Cooney RV, Jeffrey JJ. 1979. A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 254(6):1938-1943.
- Wernicke D, Seyfert C, Hinzmänn B, Gromnica-Ihle E. 1996. Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol*, 23(4):590-595.
- Westermarck J, Kahari VM. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 13(8):781-792.
- Westra J, Limburg PC, de Boer P, van Rijswijk MH. 2004. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*, 63(11):1453-1459.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22(1):176-181.
- Wu YI, Munshi HG, Sen R, Snipas SJ, Salvesen GS, Fridman R, Stack MS. 2004. Glycosylation Broadens the Substrate Profile of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase. *J Biol Chem*, 279(9):8278-8289.
- Xie Z, Singh M, Singh K. 2004. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Expression and Activity in Adult Rat Cardiac Fibroblasts in Response to Interleukin-1 {beta}. *J Biol Chem*, 279(38):39513-39519.
- Yamanaka H, Makino Ki, Takizawa M, Nakamura H, Fujimoto N, Moriya H, Nemori R, Sato H, Seiki M, Okada Y. 2000. Expression and Tissue Localization of Membrane-Types 1, 2, and 3 Matrix Metalloproteinases in Rheumatoid Synovium. *Lab Invest*, 80(5):677.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, Firestein GS. 2002a. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15):10025-10030.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, Firestein GS. 2002b. Expression and Regulation of Aggrecanase in Arthritis: The Role of TGF- {beta}. *J Immunol*, 168(3):1405-1412.
- Yang M, Kurkinen M. 1998. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J Biol Chem*, 273(28):17893-17900.
- Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. 2001. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*, 276(11):8403-8408.
- Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. 2002. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol*, 20(1):189-194.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 59(6):455-461.
- Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M. 2002. Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication. *Oncol Rep*, 9(3):607-611.

- Zeisel M, Druet V, Wachsmann D, Sibilia J. 2005. MMP-3 expression and release by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced with a bacterial ligand of integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Arthritis Res Ther*, 7(1):R118-R126.
- Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R. 2003a. Differential Inhibition of MT3-MMP and MT1-MMP by TIMP-2 and TIMP-3 regulates Pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, M308708200
- Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T. 1998. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci*, 111 (Pt 9):1147-1153.
- Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LWK, Swanson MG, Zhau HE, Kurhanewicz J, Sang QXA. 2003b. Activation of Pro-gelatinase B by Endometase/Matrilysin-2 Promotes Invasion of Human Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem*, 278(17):15056-15064.
- Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K. 2000. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *PNAS*, 97(8):4052-4057.
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW. 2001. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture -- primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res*, 3(1):72-76.
- Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S. 1999. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci*, 878:212-227.
- Zvaifler NJ. 1995. Macrophages and the synovial lining [Abstract]. *Scand J Rheumatol Suppl*, 101:67-75.
- Zvaifler NJ, Firestein GS. 1994. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37(6):783-789.

9. ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vereinfachte Darstellung eines normalen diarthroiden Gelenks und der Veränderungen in der RA.....	12
Abb. 2:	Schematische Darstellung der gesunden und der entzündeten SM.....	13
Abb. 3:	Schema zu den möglichen Ursachen der Aktivierung von Fibroblasten in der RA-SM.....	16
Abb. 4:	Schematischer Aufbau der Matrixmetalloproteinasen mit ihren Domänen.....	24
Abb. 5:	In der Synovialmembran vorliegende MMP-2-Formen.....	30
Abb. 6:	Dreidimensionale Struktur der proMMP-2.....	31
Abb. 7:	Bedeutung der MMP-2 in der RA.....	32
Abb. 8:	Vereinfachte Übersicht der Regulationsmechanismen der MMP-2.....	33
Abb. 9:	Prozessierung von proMMP-2 an der Zelloberfläche.....	35
Abb. 10 :	Arbeitskonzept der Untersuchung.....	43
Abb. 11 :	Realtime-PCR (MMP-2-mRNA-Expression).....	63
Abb. 12 :	Detektion von proMMP-2 in GT-SFB (Western-Blot).....	64
Abb. 13 :	ELISA (proMMP-2-Konzentration).....	65
Abb. 14 :	Spezifischer Aktivitäts-Assay mit APMA (Gesamt-MMP-2-Aktivität).....	67
Abb. 15 :	Beispiel zur Bestimmung der MMP-2-Aktivität in GT-SFB (Zymographie).....	68
Abb. 16 :	Zymographie (Gesamt-MMP-2-Aktivität).....	69
Abb. 17 :	Spezifischer Aktivitäts-Assay ohne APMA (Aktivität der prozessierten MMP-2).....	71
Abb. 18 :	Zymographie (Aktivität der prozessierten MMP-2).....	73
Abb. 19 :	Unspezifischer Aktivitäts-Assay (Total-MMP-Aktivität).....	75
Abb. 20 :	Beispiel zum Nachweis von TIMP in den Überständen von GT-SFB (Reverse Zymographie).....	77
Abb. 21 :	Korrelationen zwischen der proMMP-2-Konzentration und der Total-MMP-Aktivität in den Überständen von stimulierten RA-SFB und klinischen Parametern.....	79
Abb. 22 :	Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.....	82

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beispiele für physiologische und pathologische Prozesse, bei denen Matrixmetalloproteinasen am Umbau der Extrazellulärmatrix beteiligt sind	22
Tab. 2: Aufstellung nach Untergruppen der Matrixmetalloproteinasen.....	23
Tab. 3: Klinische Charakterisierung der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme	45
Tab. 4: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper	48
Tab. 5: Spezifitätskonstanten von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8 und MMP-13 für die Hydrolyse des synthetischen Substratpeptids Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	58
Tab. 6: Klinische Parameter der GT- und RA-Patienten zum Zeitpunkt der Synovektomie ...	61
Tab. 7: Prozentsatz CD90 ⁺ , Prolyl-4-Hydroxylase ⁺ , CD11b ⁺ und CD14 ⁺ SFB nach Reinigung der Zellen mittels anti-CD14-mAk-gekoppelter Magnetobeads.....	62
Tab. 8: Absolutwerte der proMMP-2-Konzentration, Gesamt-MMP-2-Aktivität und Total-MMP-Aktivität	76
Tab. 9: Korrelationen zwischen den Versuchsergebnissen und klinischen Parametern der RA-Patienten	78
Tab. 10: Übersicht über die eingesetzten Methoden und den darin erfassten Messgrößen	81

9.3 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. R. W. Kinne für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft und Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. E. Kunisch für ihre engagierte Betreuung. Durch ihre fortwährende Bereitschaft und ihren unermüdlichen Einsatz sowohl während der experimentellen Phase als auch bei der Anfertigung des Manuskripts war sie maßgeblich am Vorschreiten dieser Arbeit beteiligt.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der AG Experimentelle Rheumatologie für die tatkräftige Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. W. Lungershausen und den Mitarbeitern der Klinik für Chirurgie der FSU Jena sowie Herrn Prof. Dr. med. R.-A. Venbrocks, Herrn Dr. med. A. Roth und den Mitarbeitern der Klinik für Orthopädie der FSU Jena im Waldkrankenhauses Rudolf Elle, Eisenberg.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. A. Stelzner, Institut für Virologie der FSU Jena, und seinen Mitarbeitern für die Erlaubnis zur Mitnutzung von Geräten. Herrn Dr. rer. nat. E. Birch-Hirschfeld danke ich für die Synthese der Primer.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Familie für ihre ausnahmslose Unterstützung während dieser Arbeit sowie des gesamten Studiums.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. R. W. Kinne, Dr. rer. nat. E. Kunisch,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 19. Januar 2006

Jan-Helge Klingler

9.5 Lebenslauf

Zur Person **Jan-Helge Klingler**

Geburtsdatum/-ort	18. Dezember 1978 in Rothenburg ob der Tauber
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung / Zivildienst

06/1998	Allgemeine Hochschulreife, Uffenheim, Deutschland
04/1999 – 03/2000	Zivildienst im Pflegedienst, Klinik Uffenheim, Deutschland

Studium

09/1998 – 12/2005	Medizinstudium an der Universität Jena, Deutschland
08/2001	Ärztliche Vorprüfung
09/2002	1. Staatsexamen
09/2004	2. Staatsexamen
12/2005	3. Staatsexamen
12/2005	Approbation als Arzt

Praktisches Jahr (10/2004 - 09/2005)

Innere Medizin:	Kardiologie, Universitätsspital Bern (Inselspital), Schweiz (16 Wochen)
Chirurgie:	Herz-Thorax-Gefäß-Chirurgie, SHSC Toronto, Kanada (8 Wochen) Herz-Thorax-Gefäß-Chirurgie, LHSC London, Kanada (4 Wochen) Neurochirurgie, LHSC London, Kanada (4 Wochen)
Urologie:	Norrlands Universitetssjukhus Umeå, Schweden (16 Wochen)

Famulaturen

Innere Medizin:	Klinik Uffenheim, Deutschland (2002)
Orthopädie:	Conquest Hospital Hastings, England (2002)
Urologie:	Universitätsspital Zürich, Schweiz (2003)
Radiologie:	Universitetssjukhus Malmö, Schweden (2003)

Beruf

ab 02/2006	Assistenzarzt, Neurochirurgische Universitätsklinik, Freiburg
------------	---

Promotion

10/2002 – heute

„Einfluss von IL-1 β , TNF- α und PDGF-BB auf die Expression, Proteinkonzentration und proteolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 in kurz-passagierten synovialen Fibroblasten von Patienten mit Gelenktrauma und rheumatoider Arthritis“

Experimentelle Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Experimentelle Rheumatologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Doktorvater: Prof. Dr. R. W. Kinne

9.6 Publikationen

9.6.1 Abstracts

Kunisch E, **Klingler JH**, Winter R, Roth A, Lungershausen W, Ukena B, Prechtel J, Kinne RW. 2003. IL-1 β and TNF- α downregulate the MMP-2 (Gelatinase A) secretion in OA- and joint trauma synovial fibroblasts (SFB), but not in RA-SFB. 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie e. V. (DGfR). 03.-06. September 2003. Frankfurt/Main.

Kunisch E, **Klingler JH**, Winter R, Roth A, Fuhrmann R, Ukena B, Prechtel J, Kinne RW. 2003. Correlation between disease parameters and MMP-2 secretion in RA- and OA-synovial fibroblasts (SFB) following stimulation with IL-1 β , TNF- α , or PDGF-BB. 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie e. V. (DGfR). 03.-06. September 2003. Frankfurt/Main.

9.6.2 Originalpublikationen

Kunisch E, **Klingler JH**, Roth A, Winter R, Fuhrmann R, Lungershausen W, Kinne RW. Influence of IL-1 β , TNF- α , or PDGF-BB on mRNA expression, protein secretion, and enzymatic activity of MMP-2 in early-passage synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. J Rheumatol. In Revision.